



Estrogènes endogènes et risque cardiovasculaire chez les femmes ménopausées

Valérie Scarabin-Carré

► To cite this version:

Valérie Scarabin-Carré. Estrogènes endogènes et risque cardiovasculaire chez les femmes ménopausées. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA11T016 . tel-01294171

HAL Id: tel-01294171

<https://theses.hal.science/tel-01294171>

Submitted on 28 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Sud
Ecole Doctorale 420 – Santé Publique

THÈSE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD
Spécialité : épidémiologie

Présentée et soutenue publiquement par
Valérie Scarabin-Carré

Le 27 mars 2015

**Estrogènes endogènes et risque cardiovasculaire
chez les femmes ménopausées**

Thèse dirigée par Pierre-Yves Scarabin

Co-direction : Marianne Canonico

Membres du jury :

Président de thèse : Monsieur Jean-Philippe Empana

Directeur de thèse : Monsieur Pierre-Yves Scarabin

Rapporteur : Madame Margaret Rees

Rapporteur : Monsieur Grégoire Le Gal

EQUIPE D'ACCUEIL

Inserm - Centre de Recherche en Epidémiologie et Sante des Populations (CESP)

UMR-S 1018

Equipe « Hormones et Maladies Cardiovasculaires »

Hôpital Paul Brousse

16 avenue Paul Vaillant couturier

94807 Villejuif Cedex

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Article 1

☒ Publié ou accepté définitivement ☐ en révision ☐ soumis ☐ en préparation

High Level of Plasma Estradiol as a New Predictor of Ischemic Arterial Disease in Older Postmenopausal Women: The Three-City Cohort Study

Valérie Scarabin-Carré, Marianne Canonico, Sylvie Brailly-Tabard, Séverine Trabado, Pierre Ducimetière, Maurice Giroud, Joanne Ryan, Catherine Helmer, Geneviève Plu-Bureau, Anne Guiochon-Mantel et Pierre-Yves Scarabin.

J Am Heart Assoc, 2012 Jun;1(3):e001388. doi: 10.1161/JAHA.112.001388. Epub 2012 Jun 22.

Article 2

☒ Publié ou accepté définitivement ☐ en révision ☐ soumis ☐ en préparation

Plasma estrogen levels, estrogen receptor gene variation and ischemic arterial disease in postmenopausal women: the Three-City prospective Cohort Study

Valérie Scarabin-Carré, Sylvie Brailly-Tabard, Marie-Laure Ancelin, Cécilia Maubaret, Anne Guiochon-Mantel, Marianne Canonico, Pierre-Yves Scarabin

J Clin Endoc Metab, 2014, Aug;99(8):E1539-46. doi: 10.1210/jc.2013-4472. Epub 2014 May 13.

Article 3

☐ Publié ou accepté définitivement ☐ en révision ☐ soumis ☒ en préparation

Relationship between high endogenous estrogen levels and 10-year cardiovascular risk in older postmenopausal women: the Three-City prospective Cohort Study

Communications orales, communications affichées

Elevated endogenous estradiol as an independent predictor of coronary heart disease and ischemic stroke in older postmenopausal women: The Three-City cohort study

Marianne Canonico, Valérie Scarabin, Sylvie Brailly-Tabard, Séverine Trabado, Pierre Ducimetiere, Maurice Giroud, Joanne Ryan, Catherine Helmer, Genevieve Plu-Bureau, Anne Guiochon-Mantel, Pierre-Yves Scarabin

Communication orale au congrès de gynécologie-endocrinologie (ISGE) à Florence en mars 2012

Plasma estradiol levels, estrogen receptor polymorphisms and ischemic arterial disease in postmenopausal women: the Three-City prospective Cohort Study

Scarabin-Carré V, Brailly-Tabard S, Giroud M, Ryan J, Helmer C, Guiochon-Mantel A, Canonico M, Scarabin PY

Poster au congrès de l'American Heart Association à Dallas en novembre 2013

Impact des estrogènes endogènes et de leurs récepteurs sur le risque artériel ischémique chez les femmes ménopausées : l'étude cas-cohorte des 3 Cités

V. Scarabin-Carré, S. Brailly-Tabard, M.L. Ancelin, P. Gaussem, M. Alhenc-Gelas, A. Guiochon-Mantel, M. Canonico, P.Y. Scarabin

Communication orale au congrès de la Société Française d'Endocrinologie à Lyon en novembre 2014

RESUME EN FRANÇAIS

La relative immunité des femmes vis-à-vis du risque cardiovasculaire a longtemps été attribuée aux hormones sexuelles. Néanmoins, le rôle protecteur des estrogènes dans le développement de l'athérosclérose et de ses complications a été récemment remis en cause chez les femmes ménopausées. A partir de la cohorte française des Trois Cités incluant environ 10.000 sujets de plus de 65 ans, j'ai évalué l'association entre les estrogènes endogènes et le risque de maladies cardiovasculaires chez des femmes n'utilisant pas de traitement hormonal.

J'ai montré pour la première fois que des taux élevés d'estradiol plasmatique étaient associés à une augmentation du risque artériel ischémique à 4 ans, indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels, notamment l'obésité ou le diabète.

Dans une deuxième partie, j'ai étudié le rôle modulateur des polymorphismes génétiques des récepteurs des estrogènes α (*ESR1*) et β (*ESR2*). J'ai montré que le risque cardiovasculaire augmentait avec les taux élevés d'estradiol chez les femmes porteuses du génotype *rs9340799-AA* mais pas chez celles avec le génotype *rs9340799-AG/GG*. Des analyses complémentaires m'ont également permis de suggérer que l'effet des estrogènes était lié en partie à une hypercoagulabilité et/ou un état inflammatoire.

Dans une dernière étape, j'ai évalué le rôle prédictif à long terme des estrogènes endogènes. J'ai confirmé la relation indépendante entre les taux élevés d'estrogènes et la survenue d'un événement cardiovasculaire après 10 ans de suivi.

Globalement, ces résultats suggèrent un effet délétère des estrogènes dans le développement des maladies artérielles ischémiques chez les femmes ménopausées après 65 ans. Si ces résultats étaient confirmés, une meilleure stratification du risque artériel pourrait être proposée chez les femmes ménopausées avec des implications potentielles dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

MOTS-CLES : Estradiol • Risque cardiovasculaire • Femmes ménopausées • Polymorphismes des récepteurs des estrogènes

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

The low incidence of coronary heart disease among women has often been attributed to sex hormones. However, adverse effects of estrogens on arterial disease have been recently reported in older postmenopausal women. In the French Three-City prospective cohort study of subjects over 65 years of age, I investigated the association of endogenous estradiol with cardiovascular risk among postmenopausal women who did not use any hormone therapy.

In a first part, I showed that high levels of plasma estradiol were related to the 4-year incidence of ischemic arterial disease (IAD), independently of traditional cardiovascular risk factors such as obesity or diabetes.

Then, I reported that the relation between estrogens and IAD risk could be modulated by estrogen receptor- α (*ESR1*) polymorphisms. Indeed, endogenous estrogens were positively associated with IAD risk in women carrying the *ESR1 rs9340799*-AA genotype but not in those carrying the *ESR1 rs9340799*-AG/GG genotype. Further analyses revealed that both hypercoagulability and inflammatory state might act as mediators.

Finally, I assessed the long-term predictor role of endogenous estrogens in arterial disease. I showed a positive and independent association of estrogens levels with the 10-year incidence of cardiovascular disease.

Overall, high plasma levels of endogenous estradiol emerge as a new significant predictor of cardiovascular disease in older postmenopausal women. If confirmed, these findings could have the potential to improve the stratification of IAD risk in postmenopausal women.

KEYWORDS: Estradiol • Postmenopausal women • Cardiovascular risk • Estrogen receptor polymorphisms

REMERCIEMENTS

Je remercie très chaleureusement Pierre-Yves Scarabin, mon directeur de thèse, pour son aide inconditionnelle et sa grande disponibilité dans l'élaboration de ce travail. Il m'a permis de terminer ces travaux dans de bonnes conditions malgré toutes les difficultés rencontrées. Je souhaiterais également saluer ses qualités humaines et son indulgence qui n'enlève en rien son exigence professionnelle. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir transmis une partie de ses connaissances et de son expérience en épidémiologie. C'est avec grand plaisir que j'ai travaillé avec lui. J'espère que nous pourrons poursuivre ensemble cette recherche.

Je tiens à remercier Madame Margaret Rees d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse. C'est un honneur de la compter parmi les membres de mon jury.

Je souhaiterais remercier également Grégoire Le Gal d'être rapporteur de ma thèse. Je l'ai connu lorsqu'il était doctorant, le temps a passé et c'est à mon tour aujourd'hui de lui exposer les résultats de mes travaux. J'espère que je me montrerai à la hauteur de ses attentes.

Je remercie Jean-Philippe Empana qui me fait l'honneur de présider mon jury. J'ai apprécié la qualité de son enseignement au sein de l'Ecole Doctorale.

Je remercie plus particulièrement Marianne Canonico pour son aide précieuse dans la réalisation de ces travaux, tant sur le plan professionnel que personnel. C'était très agréable de travailler à ses côtés et je la remercie pour son efficacité et son dynamisme. Merci également pour son écoute et ses conseils dans les moments délicats.

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à Geneviève Plu-Bureau qui m'a toujours encouragée à accomplir ce travail. Son aide m'a été très précieuse, notamment dans l'obtention de temps dédié à ce projet. Je la remercie aussi pour son soutien et ses conseils durant ces longues années. J'espère que nous trouverons d'autres occasions pour travailler ensemble.

Je tiens à remercier toute l'équipe « Hormones et Maladies Cardiovasculaires » du CESP pour leur accueil et leur soutien. Merci à Valérie, Laure, Véronique et Assia pour votre bonne humeur tout au long de ces années et votre aide dans l'utilisation de SAS,

particulièrement pour « merger » mes bases... Merci Françoise pour ton aide et tes mots toujours réconfortants. Merci Justine pour ton soutien notamment à l'hôpital, c'est à toi de jouer maintenant !

Je tiens à adresser mes remerciements à toutes les équipes de Gynécologie-Obstétrique des Hôpitaux Antoine Béchère et Bicêtre, particulièrement Alexandra Benachi, Renato Fanchin et Hervé Fernandez pour m'avoir accordé le temps nécessaire à la finalisation de ces travaux. Merci également à toute l'équipe d'AMP pour leur indulgence et leur compréhension, notamment à Vanessa Gallot qui m'a été d'une aide très précieuse toutes ces années !

Je remercie très affectueusement mon mari Guillaume pour son soutien sans faille et son dévouement pendant ces longues années d'étude. Merci pour sa patience et sa compréhension. Sans lui, je n'aurais pas pu mener à bien cette thèse. J'ai toujours pu compter sur lui dans les moments les plus cruciaux et je n'oublierai jamais tous les sacrifices qu'il a faits pour moi.

Je remercie du fond du cœur ma fille Estelle pour son existence et pour tout le bonheur qu'elle me procure chaque jour. Elle est un véritable rayon de soleil qui me donne la force d'avancer chaque jour.

Je remercie toute ma famille, particulièrement mes parents pour m'avoir transmis leur passion de la médecine. Tout au long de ces années, ils m'ont aidée à prendre confiance en moi. Sans eux, je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui. Merci également à mes grandes sœurs Catherine et Laure pour leur affection et leur soutien moral. Elles ont toujours été présentes pour me réconforter. J'espère que je serai maintenant un peu plus disponible pour profiter de Giulia et Loëvan. Merci également à ma belle-famille, Brigitte, Jean, Juliette, Bertrand et Victor pour leur disponibilité et leur chaleureux soutien dans ma vie personnelle.

Je remercie également l'ensemble de mes amis, particulièrement Anne qui a toujours suivi de près mes études. Elle toujours su m'épauler et me réconforter au moment où j'en avais le plus besoin.

TABLE DES MATIERES

Equipe d'accueil	2
Productions scientifiques.....	3
Résumé en français.....	5
Résumé en anglais	6
Remerciements	7
Table des matières	9
Liste des figures	12
Liste des tables	13
Liste des abréviations	15
I. Introduction	17
A. Les maladies artérielles ischémiques.....	19
1. Etiopathogénie des maladies artérielles ischémiques	19
2. Incidence des maladies artérielles ischémiques	20
3. Facteurs de risque cardiovasculaire	22
B. Les estrogènes	24
1. Synthèse des estrogènes	24
2. Evolution de la synthèse des estrogènes avec l'âge	25
3. Mécanisme d'action vasculaire des estrogènes via leurs récepteurs.....	26
C. Maladies artérielles ischémiques chez les femmes ménopausées	31
1. Estrogènes et risque artériel ischémique	31
2. Polymorphisme des récepteurs des estrogènes et risque artériel ischémique	31
II. Objectifs	33
III. Méthodes	35
A. Population et collection des données : l'étude des 3 Cités	36
1. Protocole de l'étude	36
2. Recueil des données	36

3.	Facteurs de risque cardiovasculaire	37
4.	Définition et validation des cas	38
B.	Etude cas-cohorte	39
C.	Mesure des paramètres biologiques et génétiques.....	43
1.	Mesure des hormones sexuelles.....	43
2.	Mesure des autres paramètres biologiques.....	45
3.	Génotypage des polymorphismes des ER.....	46
D.	Analyses statistiques.....	48
1.	Analyse descriptive	48
2.	Distribution et déterminants des hormones sexuelles	49
3.	Polymorphismes génétiques des ER	49
4.	Facteurs de risque cardiovasculaire	50
5.	Estrogènes et risque artériel ischémique.....	50
IV.	Résultats	58
A.	Caractéristiques des sujets à l'inclusion	59
B.	Distribution et déterminants des hormones sexuelles endogènes.....	61
1.	Distribution des hormones sexuelles endogènes.....	61
2.	Déterminants des hormones sexuelles endogènes	62
C.	Estrogènes endogènes et risque artériel ischémique à 4 ans	66
1.	Facteurs de risque cardiovasculaire	66
2.	Estrogènes endogènes et risque artériel ischémique	68
3.	Estrogènes endogènes et risque artériel ischémique en fonction des polymorphismes génétiques associés aux estrogènes	78
D.	Estrogènes endogènes et risque cardiovasculaire après 10 ans de suivi	89
V.	Discussion.....	94
A.	Synthèse des principaux résultats	95
B.	Données antérieures.....	96
1.	Estrogènes endogènes et risque cardiovasculaire	96
2.	Polymorphismes des ER et risque cardiovasculaire	97
C.	Interprétation des données	99
1.	Interprétation non causale des résultats	99
2.	Mécanismes biologiques potentiels	102

D.	Forces et limites.....	106
1.	Forces de l'étude	106
2.	Limites de l'étude	107
VI.	Conclusion.....	110
	Références	112
	Articles	123

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Athérogénèse et ses complications	20
Figure 2. Incidence de l'infarctus du myocarde en fonction de l'âge chez les hommes et les femmes. D'après MONICA (6).....	22
Figure 3. Biosynthèse de l'estradiol à partir du cholestérol (d'après Naessen (38)).....	24
Figure 4. Gène encodant le récepteur ER α : ESR1 (d'après Herrington et al. (41)).....	27
Figure 5. Mécanisme d'action des récepteurs des estrogènes (d'après Heldring et al. (42); Hall et al. (43))	28
Figure 6. Effets des estrogènes sur les vaisseaux sanguins (d'après Mendelsohn (44)).....	29
Figure 7. Echantillonnage de l'étude cas-cohorte.....	41
Figure 8. Pondérations des différents sujets dans le modèle de Cox adapté à une étude cas-cohorte	54
Figure 9. Distribution des hormones sexuelles endogènes dans la sous-cohorte (n=537 femmes).....	61
Figure 10. Hazard Ratio (IC 95%) de maladie artérielle ischémique en relation avec les quartiles d'estradiol en fonction du génotype <i>rs9340799</i>	85
Figure 11. Impact des paramètres de l'hémostase et de l'inflammation sur la relation entre l'estradiol et le risque artériel ischémique chez les femmes porteuses du génotype <i>rs9340799-AA</i>	89

LISTE DES TABLES

Tableau 1. Caractéristiques des femmes à l'inclusion dans la cohorte 3C et la sous-cohorte..	60
Tableau 2. Moyenne des hormones sexuelles selon le centre de recrutement parmi les 537 femmes de la sous-cohorte	62
Tableau 3. Moyenne des hormones sexuelles endogènes en fonction des caractéristiques à l'inclusion parmi les femmes de la sous-cohorte (n=537)	64
Tableau 4. Coefficients de corrélation entre les hormones sexuelles et les paramètres biologiques dans la sous-cohorte (537 femmes)	65
Tableau 5. Déterminants de l'estradiol parmi 537 femmes de la sous-cohorte	65
Tableau 6. Comparaison des caractéristiques à l'inclusion entre les cas et les non-cas de maladies artérielles ischémiques chez 628 femmes de l'étude cas-cohorte 3C	67
Tableau 7. Comparaison des paramètres biologiques à l'inclusion entre les cas et les non-cas de maladies artérielles ischémiques chez 628 femmes de l'étude cas-cohorte 3C	68
Tableau 8. Moyenne des hormones sexuelles endogènes en fonction du statut cas/non-cas de maladie artérielle ischémique parmi 628 femmes de l'étude cas-cohorte 3 C	69
Tableau 9. Hazard ratios de maladie artérielle ischémique en fonction du taux d'hormones sexuelles parmi 628 femmes ménopausées dans l'étude cas-cohorte 3C	70
Tableau 10. Analyse stratifiée du risque artériel ischémique en relation avec les taux d'hormones sexuelles en fonction des niveaux de facteurs de risque cardiovasculaire parmi 628 femmes dans l'étude cas-cohorte 3C	72
Tableau 11. Hazard ratios de cardiopathie ischémique en fonction du taux d'hormones sexuelles parmi 619 femmes ménopausées dans l'étude cas-cohorte 3C	74
Tableau 12. Hazard ratios d'AVC ischémique en fonction du taux d'hormones sexuelles parmi 627 femmes ménopausées dans l'étude cas-cohorte 3C	75
Tableau 13. Analyse de sensibilité du risque de maladie artérielle ischémique en fonction des taux d'hormones sexuelles chez 628 femmes ménopausées dans l'étude cas-cohorte 3C	77
Tableau 14. Fréquence allélique et génotypique des polymorphismes génétiques des récepteurs des estrogènes parmi les femmes de la sous-cohorte (n=533)	79
Tableau 15. Taux d'estradiol en fonction des polymorphismes génétiques des ER parmi les femmes de la sous-cohorte 3C (n=533)	80
Tableau 16. Hazard ratio de maladie artérielle ischémique en fonction des polymorphismes génétiques des ER parmi 623 femmes ménopausées de l'étude cas-cohorte 3C	82

Tableau 17. Hazard ratio de maladie artérielle ischémique en relation avec l'estradiol en fonction des polymorphismes génétiques de <i>ESR1</i> parmi 623 femmes ménopausées de l'étude cas-cohorte 3C.....	83
Tableau 18. Hazard ratio de maladie artérielle ischémique en relation avec l'estradiol en fonction des polymorphismes génétiques de <i>ESR2</i> parmi 623 femmes ménopausées de l'étude cas-cohorte 3C.....	84
Tableau 19. Hazard ratio de cardiopathie ischémique en relation avec l'estradiol en fonction des polymorphismes génétiques des ER parmi les femmes ménopausées de l'étude cas-cohorte 3C	86
Tableau 20. Hazard ratio d'AVC ischémique en relation avec l'estradiol en fonction des polymorphismes génétiques des ER parmi les femmes ménopausées de l'étude cas-cohorte 3C	87
Tableau 21. Impact des paramètres de l'hémostase et de l'inflammation sur la relation entre l'estradiol et le risque artériel ischémique chez les femmes porteuses du génotype <i>rs9340799-AA</i> (n=266)	88
Tableau 22. Risque cardiovasculaire (cardiopathie ischémique, AVC ou décès cardiovasculaire) après 10 ans de suivi en fonction des taux d'hormones sexuelles parmi 623 femmes ménopausées de la sous-cohorte 3C n'utilisant pas de THM.....	91
Tableau 23. Risque de cardiopathie ischémique après 10 ans de suivi en fonction des taux d'hormones sexuelles parmi 623 femmes ménopausées de la sous-cohorte 3C n'utilisant pas de THM	92
Tableau 24. Impact des paramètres de l'hémostase et de l'inflammation sur la relation entre l'estradiol et le risque cardiovasculaire après 10 ans de suivi parmi 623 femmes ménopausées de la sous-cohorte 3C n'utilisant pas de THM.....	93

LISTE DES ABREVIATIONS

3C : Trois Cités
ATC : Anatomique, Thérapeutique et Chimique
AVC : Accident vasculaire cérébral
CIM : Classification internationale des maladies
CRP : C-Reactive Protéine
E1 : Estrone
E2 : Estradiol
E3 : Estriol
ECG : Electrocardiogramme
ER : Récepteur des estrogènes
ERE : Estrogen Response Element
ETP : Endogenous thrombin potential
FDR CV : Facteurs de risque cardiovasculaire
Fg : Fibrinogène
FvW : Facteur von Willebrand
HR : Hazard ratio
IC 95% : Intervalle de confiance à 95%
IDM : Infarctus du myocarde
IL-6 : Interleukine-6
IMC : Indice de masse corporelle
NO : Monoxyde d'azote
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
SERM : Modulateur spécifique des récepteurs des estrogènes
SHBG : Sex-hormone binding globulin
SNP : « Single-Nucleotide Polymorphisms » ou polymorphisme nucléotidique
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
T : Testostérone
TGT : Test de génération de thrombine
THM : Traitement hormonal de la ménopause
WHI : Women's Health Initiative

A mon père,

A mon mari,

I. INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires représentent la principale menace pour la santé des femmes. Elles sont responsables d'environ 80.000 décès par an en France et se manifestent le plus souvent sous la forme de cardiopathies ischémiques (infarctus du myocarde (IDM) et angor) ou d'accident vasculaire cérébral (AVC). A tous les âges de la vie, leur incidence reste cependant plus faible comparée à celle des hommes. Les femmes bénéficient en effet d'une protection coronaire qui ne peut s'expliquer à partir des seuls facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels. Cette relative immunité féminine a souvent été attribuée aux hormones sexuelles notamment aux estrogènes. Leur rôle dans le développement des maladies artérielles ischémiques reste aujourd'hui incertain en particulier après la ménopause.

Après avoir rappelé les principales caractéristiques des maladies artérielles ischémiques (étiopathogénie, incidence, facteurs de risque), nous décrirons les grandes lignes de la physiologie des estrogènes, notamment leur synthèse et leur mécanisme d'action. Enfin, nous nous intéresserons à la relation entre les estrogènes endogènes et la survenue d'événements artériels ischémiques.

A. Les maladies artérielles ischémiques

1. Etiopathogénie des maladies artérielles ischémiques

La paroi artérielle se caractérise par 3 tuniques concentriques : l'intima au contact de la lumière constituée d'un endothélium, la média comportant des fibres musculaires lisses et l'adventice composée de fibres de collagène et d'élastine. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), l'athérome est défini par des « remaniements de l'intima et de la média des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires ». Ce processus dégénératif des artères lié principalement à une dysfonction endothéliale permet l'entrée du LDL cholestérol dans la paroi artérielle et son accumulation dans l'intima sous forme oxydée. L'endothélium lésé va ensuite favoriser le recrutement de monocytes. Ces derniers pénètrent ainsi dans l'intima pour capter le LDL et se transformer en macrophages, puis en cellules spumeuses. L'association de ces cellules spumeuses aux lipides forme le noyau lipidique de la plaque. Parallèlement à ces mécanismes, les cellules musculaires lisses se multiplient et sécrètent du collagène et de la matrice extracellulaire pour former la chape fibreuse de la plaque qui sépare le noyau lipidique de l'intima. Ces remaniements artériels forment alors des plaques d'athérome responsables d'un épaississement de la paroi artérielle et d'une réduction progressive de la lumière artérielle lors de leur développement (Figure 1). A plus ou moins long terme, si la sténose se situe dans les artères coronaires, ces lésions peuvent se traduire cliniquement par un angor et entraîner une ischémie myocardique chronique. Ces lésions peuvent conduire à la réalisation d'un pontage aortocoronarien ou d'une angioplastie caractérisée par la dilatation de l'artère associée ou non à la pose d'un stent. La plaque d'athérome peut également se compliquer d'ulcération ou de rupture à l'origine de thrombose voire d'embolie artérielle. Dans ce cas, la mise en contact du noyau lipidique de la plaque avec la circulation sanguine entraîne une activation de la coagulation et la constitution d'un thrombus. Ce phénomène d'obstruction artérielle est responsable cliniquement d'un infarctus du myocarde pour les artères coronaires, d'un AVC pour les artères des tronc supra-aortiques ou encore d'une ischémie aigue des membres inférieurs pour les artères des membres inférieurs. Dans cette thèse, nous nous sommes concentrés sur

les AVC et les cardiopathies ischémiques incluant notamment l'angor, l'IDM, l'angioplastie et le pontage aortocoronarien.

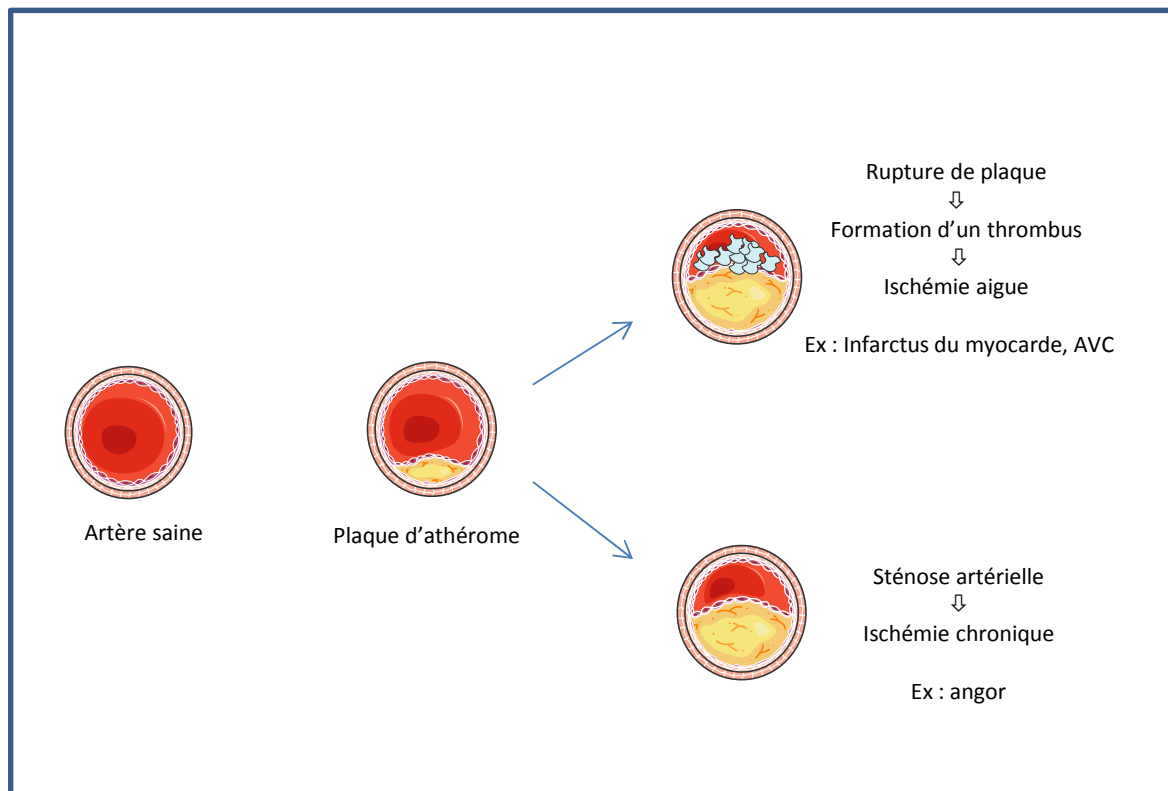


Figure 1. Athérogénèse et ses complications

2. Incidence des maladies artérielles ischémiques

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde et sont responsables de 15,2 millions de décès par an, soit 27 % de la mortalité totale (1). Bien que la mortalité cardiovasculaire diminue depuis plusieurs années, elle devrait rester la première cause de mortalité d'ici 2030 avec près de 23,3 millions de décès.

Ces maladies sont le plus souvent d'origine artérielle et de nature ischémique (IDM, AVC). Elevée dans les pays développés, leur incidence est en augmentation dans les pays à revenu faible ou moyen. Aux Etats-Unis, le taux de décès attribuables à une maladie cardiovasculaire est de 235 pour 100 000 personnes (2). En France depuis 2004, les maladies cardiovasculaires représentent la 2ème cause de mortalité après les cancers avec une part de

27.5%. Néanmoins, elles demeurent au premier rang chez les femmes (30,1%) avec une légère prédominance des maladies cérébrovasculaires (24%) sur les cardiopathies ischémiques (21%) (3).

L'incidence des maladies cardiovasculaires augmente considérablement avec l'âge. En France, elles sont responsables d'un tiers des décès après 65 ans (3). La Framingham Heart Study a montré une augmentation de leur incidence chez les femmes de 8.9 ‰ à 20.0 ‰ pour les tranches d'âges respectives de 55-64 ans et 65-74 ans (4). Aux Etats-Unis, l'âge moyen de survenue d'un IDM est de 72 ans chez les femmes et de 65 ans chez les hommes (2).

L'incidence des maladies cardiovasculaires diffère selon le sexe avec une prédominance des cardiopathies ischémiques chez les hommes. Ainsi, l'infarctus du myocarde affecte près de 2 fois plus les hommes que les femmes avec une incidence respective dans le monde de 195 et 115 pour 100 000 (5). En France, le taux de mortalité par cardiopathies ischémiques est 2,4 fois plus élevé chez les hommes que chez les femmes (3). Cette différence de risque liée au sexe tend néanmoins à s'estomper avec l'âge. Les cardiopathies ischémiques sont rares chez les femmes avant 50 ans mais leur incidence augmente par la suite pour atteindre au cours du vieillissement des taux comparables à ceux observés chez les hommes (6) (figure 2). Le risque d'AVC varie peu en fonction du sexe. Son incidence chez les hommes est légèrement supérieure à celle des femmes (14.9 ‰ et 13.7 ‰ respectivement) (4, 7) mais cette différence a tendance à s'inverser avec l'âge (8-10).

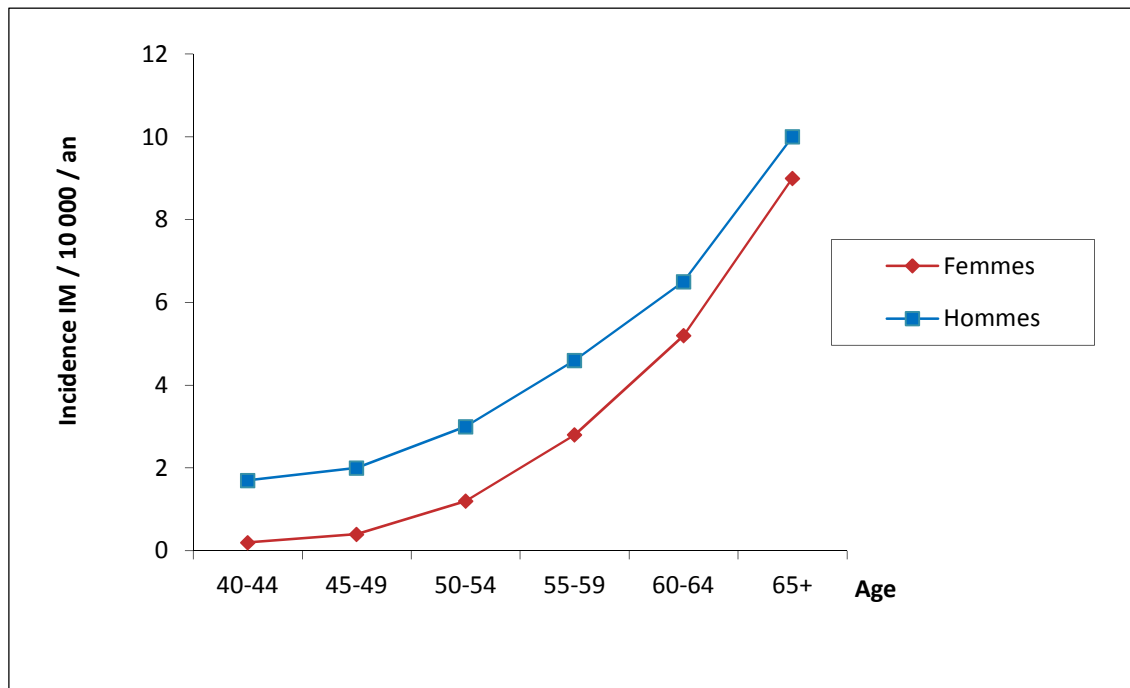


Figure 2. Incidence de l'infarctus du myocarde en fonction de l'âge chez les hommes et les femmes. D'après MONICA (6)

3. Facteurs de risque cardiovasculaire

L'âge n'est pas le seul facteur de risque impliqué dans le développement des maladies artérielles ischémiques. L'obésité, le diabète, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le tabagisme contribuent également à l'augmentation de leur incidence et sont considérés comme des facteurs de risque cardiovasculaire majeurs (11-14). A l'exception du tabagisme, leur prévalence augmente considérablement avec l'âge. Cet effet est particulièrement marqué pour l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycémie (15). En France, la prévalence du diabète et de l'obésité augmente respectivement de 0.5 % à 14 % et de 9.9 % à 17 % entre les âges de 30 et 65 ans (16). L'hypertension artérielle concerne 70 % des sujets après 65 ans (2) et constitue l'un des facteurs de risque majeurs d'AVC pour lequel le risque attribuable est de 30% (17). Néanmoins, cette part de risque liée à l'hypertension artérielle serait moins importante chez les sujets âgés après 80 ans (17). De façon similaire, la valeur prédictive des autres facteurs de risque cardiovasculaire diminue également après 65 ans (18), notamment l'obésité (19), le diabète (17) et l'hypercholestérolémie (20, 21).

La répartition par sexe des principaux facteurs de risque cardiovasculaire a fait l'objet de nombreuses investigations montrant dans l'ensemble que les femmes ont un meilleur profil

que les hommes : prévalence plus faible du tabagisme (11, 22), taux sanguin plus élevé de HDL-cholestérol (23, 24) et meilleur comportement de santé (2). Ces différences ne peuvent cependant pas expliquer à elles seules pourquoi les femmes sont protégées des cardiopathies ischémiques (24). De plus, certains facteurs de risque peuvent avoir un effet différentiel sur le développement de l'athérothrombose en fonction du sexe. Par exemple, l'impact du tabagisme serait plus important chez les femmes avec un risque de cardiopathie ischémique augmenté de 25% par rapport aux hommes (11). De même, le diabète apparaît plus délétère chez les femmes qui perdent ainsi dans ce contexte leur protection coronaire par rapport aux hommes (25, 26).

A partir de ces facteurs de risque, différents scores ont été établis pour prédire le risque individuel cardiovasculaire à 5 ou 10 ans, respectivement pour les hommes et les femmes. Le score de Framingham est le plus couramment utilisé et il consiste à calculer la probabilité absolue de développer un événement cardiovasculaire à partir d'un algorithme dans lequel une pondération est attribuée à chaque facteur de risque (27). Sa validité externe reste cependant limitée et des équations de risque spécifiques ont été proposées dans les pays européens notamment en France (28). De plus, si ces scores permettent une bonne prédiction du risque cardiovasculaire, ils n'expliquent qu'une part de l'ensemble des événements cliniques et ne sont pas nécessairement adaptés à un âge avancé. Ils ne tiennent pas compte, d'autre part, des caractéristiques liées à la vie reproductive des femmes. Il apparaît donc opportun de rechercher de nouveaux facteurs étiologiques pour améliorer la stratification du risque cardiovasculaire, notamment chez les femmes au cours du vieillissement. Certains paramètres de l'hémostase et de l'inflammation ont été identifiés comme de nouveaux biomarqueurs du risque cardiovasculaire. Des études antérieures ont montré que des taux élevés de C-réactive protéine (CRP) et de fibrinogène augmentaient le risque artériel ischémique chez les hommes et les femmes (29-31). D'autres biomarqueurs seuls ou combinés peuvent également améliorer la prédiction d'un premier événement cardiovasculaire (32-37). Bien que souvent évoqué, le rôle des hormones sexuelles et notamment des estrogènes chez les femmes a été peu étudié et leur contribution reste incertaine en particulier chez les femmes ménopausées.

B. Les estrogènes

1. Synthèse des estrogènes

Les estrogènes sont des hormones stéroïdes existant sous 3 formes. Les deux formes physiologiques principales sont le 17 β -estradiol (E2) correspondant à l'hormone la plus active et l'estrone (E1). La 3^{ème} forme d'estrogènes, l'estriol (E3), n'est synthétisée qu'au cours de la grossesse. Les estrogènes sont sécrétés principalement dans les ovaires, mais également dans des organes périphériques incluant notamment le sein, l'os, le tissu adipeux et les surrénales. Leur synthèse s'effectuant à partir du métabolisme du cholestérol et de la prégnélonone implique de multiples enzymes conduisant à la formation d'androstènedione et de testostérone, précurseurs directs des estrogènes (Figure 2). L'androstènedione et la testostérone sont ensuite converties par l'aromatase en estrone et estradiol respectivement.

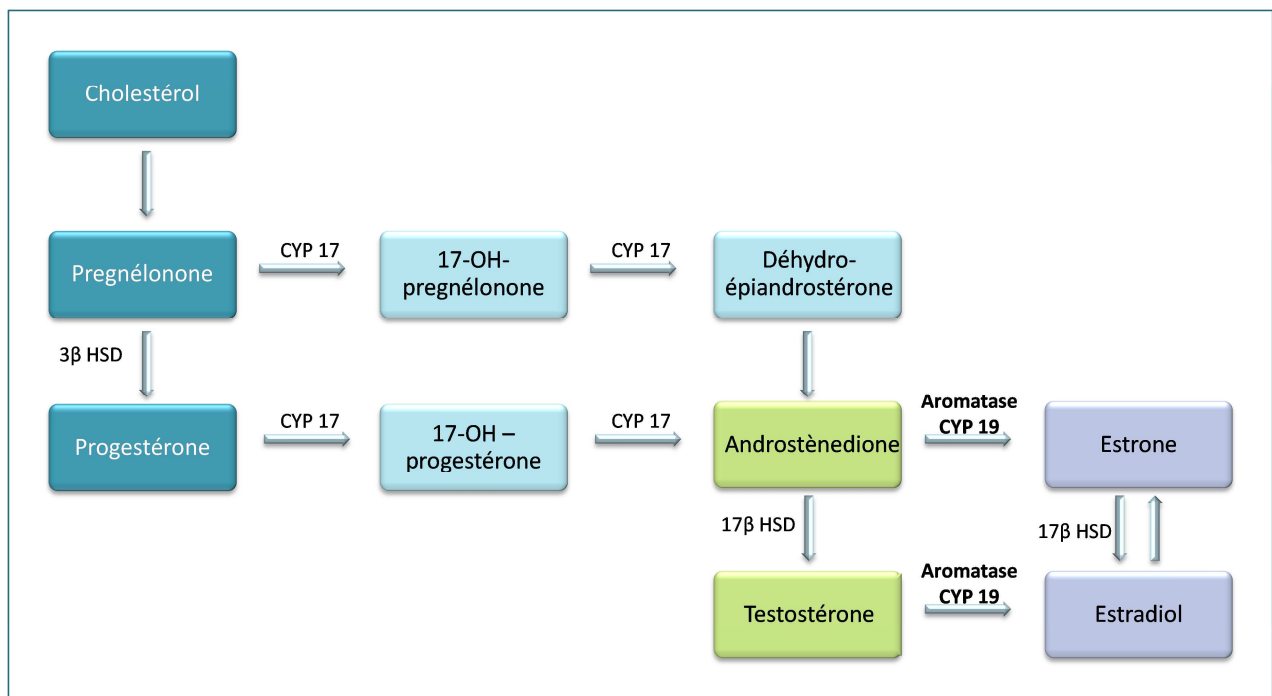


Figure 3. Biosynthèse de l'estradiol à partir du cholestérol (d'après Naessen (38))

Une fois synthétisé, l'estradiol circule dans le sang sous forme libre en très faible quantité. En grande majorité, elle est liée à des protéines de transport, notamment la sex hormone binding globulin (SHBG) (52%) avec une forte affinité et à l'albumine (48%) plus

faiblement (39). Seules les fractions libres et liées à l'albumine peuvent atteindre les tissus cibles. Elles constituent ainsi la forme biologiquement active de l'estradiol appelée biodisponible.

2. Evolution de la synthèse des estrogènes avec l'âge

La puberté chez la femme est marquée par l'apparition des premières règles. Ce phénomène se traduit physiologiquement par le début de l'activité ovarienne via l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cette activité ovarienne est définie par son caractère cyclique liée au recrutement mensuel d'un follicule destiné à l'ovulation et perdue jusqu'à épuisement de la réserve ovarienne folliculaire. Cette période de la femme se caractérise par une sécrétion continue des estrogènes par les ovaires avec des taux plasmatiques d'estradiol plus élevés en fonction de la période du cycle, notamment en phase préovulatoire ou en cas de grossesse.

La ménopause est la conséquence de l'épuisement de la réserve ovarienne et se définit cliniquement par une aménorrhée supérieure à 12 mois. Sur le plan biologique, elle se traduit par une diminution considérable de la concentration plasmatique des estrogènes, liée à leur faible synthèse par les ovaires. Cependant, la sécrétion estrogénique persiste dans les tissus périphériques notamment le tissu adipeux devenant ainsi la principale source des estrogènes. La diminution de la synthèse des estrogènes liée à la ménopause est plus marquée pour l'estradiol que pour l'estrone. En effet, l'estrone est synthétisé en plus forte proportion que l'estradiol dans les tissus périphériques et devient alors prépondérant chez les femmes ménopausées. Néanmoins, il est considéré comme secondaire comparé à l'estradiol, en raison de ses faibles propriétés estrogéniques dues à sa faible affinité pour les récepteurs des estrogènes (ER) (40).

3. Mécanisme d'action vasculaire des estrogènes via leurs récepteurs

a) *Généralités*

Les estrogènes agissent sur différents tissus cibles en se fixant sur leurs récepteurs. Les récepteurs des estrogènes ER α et ER β sont des récepteurs stéroïdiens respectivement codés par les gènes *ESR1* et *ESR2* situés sur les chromosomes 6 et 14 (figure 4). Fortement homologues, ER α et ER β s'expriment de façon variable et spécifique dans les tissus mammaire, ovarien, osseux, hépatique, cérébral et cardiaque. Appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires, ce sont par définition des facteurs de transcription ligand-dépendant. Suite à la liaison de l'E2 sur l'ER, le complexe E2-ER induit une cascade d'événements permettant à la cellule de moduler ses activités en réponse à ce stimulus.

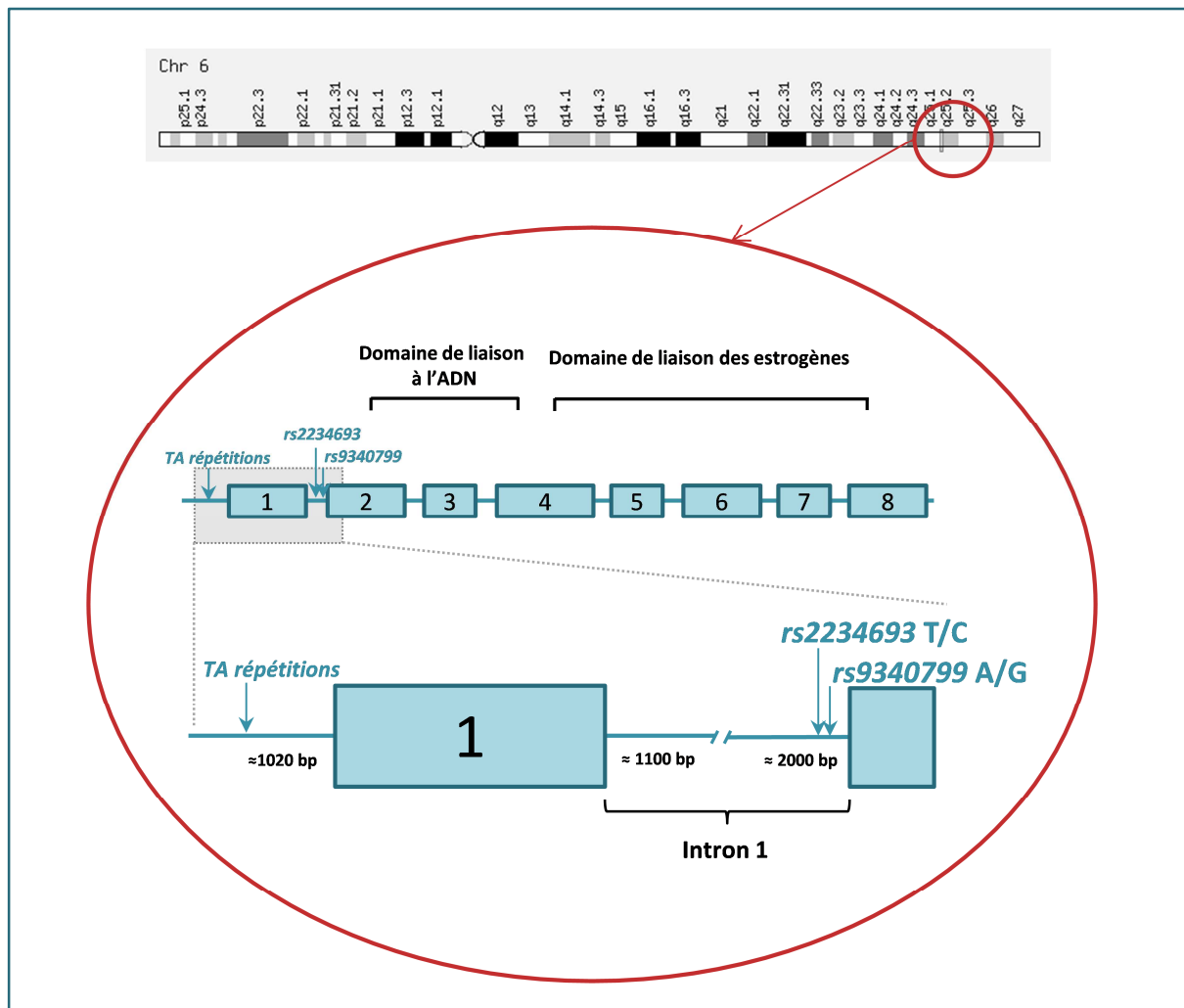


Figure 4. Gène encodant le récepteur ER α : *ESR1* (d'après Herrington et al. (41))

Les estrogènes peuvent agir selon différentes voies de signalisation : la voie génomique et la voie non génomique (Figure 5). La voie génomique dite « classique » permet d'activer la transcription de gènes cibles suite à la fixation du complexe E2-ER à une séquence spécifique de l'ADN appelée ERE (Estrogen Response Element), située en amont des gènes cibles. Il existe également deux autres voies de signalisation génomique permettant la transcription de gènes cibles : ERE-indépendante et ligand-indépendante, dans lesquelles d'autres cofacteurs ou facteurs de transcriptions sont recrutés. La voie non génomique correspond à un effet des estrogènes rapide qui ne résulte pas de la transcription d'un gène ou de la synthèse d'une nouvelle protéine. Cette action rapide des estrogènes consiste en l'activation de plusieurs voies cellulaires, notamment la cascade des kinases, afin de moduler directement la fonction de certaines protéines.

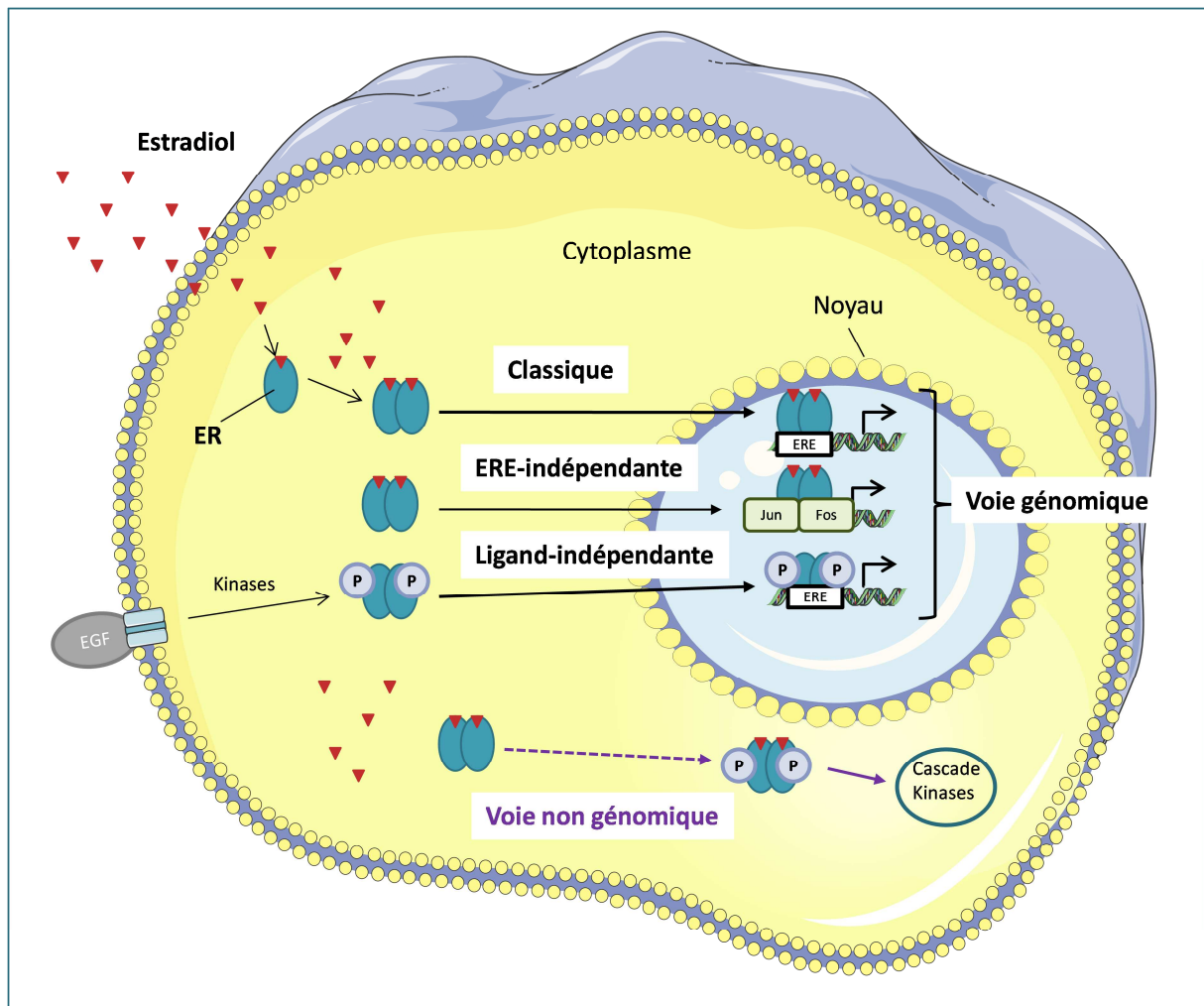


Figure 5. Mécanisme d'action des récepteurs des estrogènes (d'après Heldring et al. (42); Hall et al. (43))

b) Effets biologiques des estrogènes sur les vaisseaux

Par ces différentes voies de signalisation, les estrogènes peuvent agir directement sur les artères en se fixant sur les ER présents dans les cellules endothéliales et musculaires lisses (Figure 6). Par voie non génomique, les estrogènes peuvent induire de façon rapide la vasodilatation d'une artère, par libération de monoxyde d'azote (NO) et relaxation des cellules musculaires lisses (44). Par voie génomique, les estrogènes auraient un effet à plus long terme sur les vaisseaux qui limiterait le développement de l'athérosclérose, en favorisant l'intégrité de l'endothélium des artères et en inhibant la croissance des cellules musculaires lisses. De plus, ils augmentent le taux de HDL-cholestérol qui est un facteur protecteur

cardiovasculaire (41). Au regard de ces différents mécanismes, les estrogènes semblent jouer un rôle plutôt protecteur sur le risque cardiovasculaire.

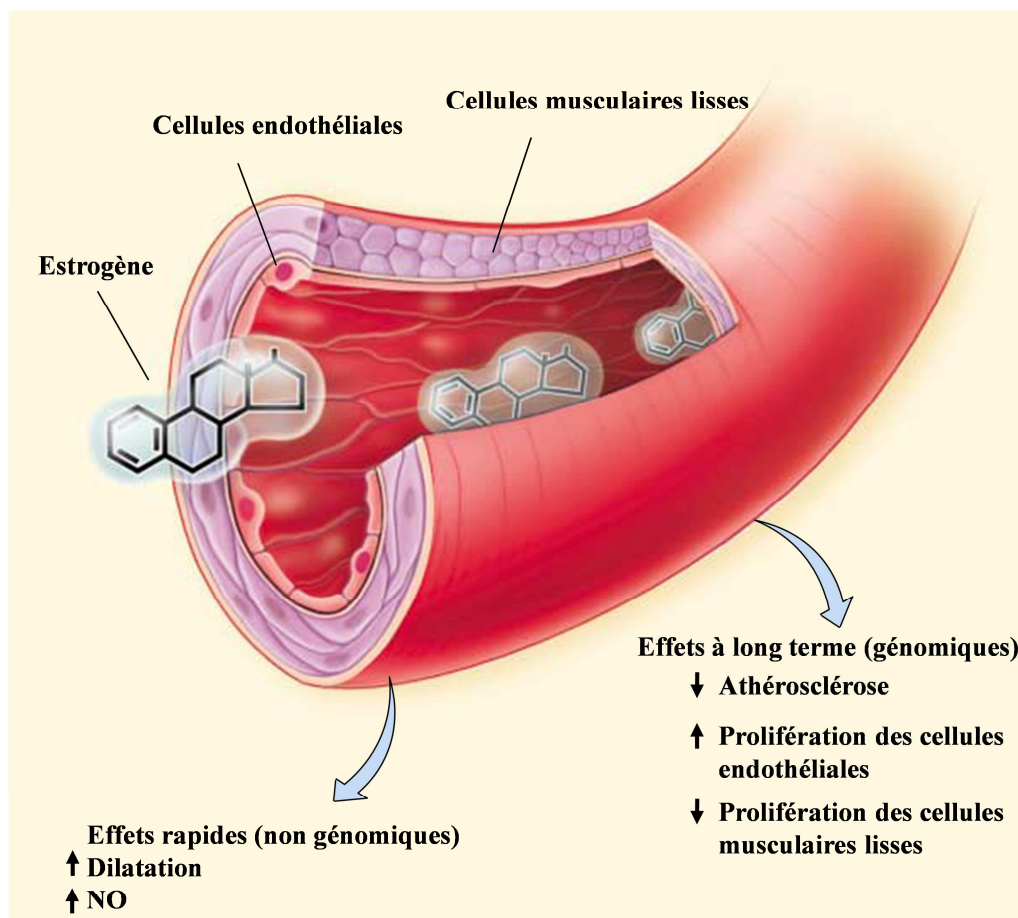


Figure 6. Effets des estrogènes sur les vaisseaux sanguins (d'après Mendelsohn (44))

Les estrogènes peuvent jouer également un rôle indirect sur le système cardiovasculaire, en modulant notamment la synthèse de certains paramètres de l'hémostase ou de l'inflammation impliqués dans l'athérothrombose. En effet, l'expression hépatique de plusieurs gènes codant pour des facteurs de coagulation est régulée par les estrogènes via le récepteur ER α (44). De plus, les estrogènes favoriseraient un état proinflammatoire dont le mécanisme est complexe et mal connu. Des études expérimentales ont montré que le complexe E2/ER augmentait la production de marqueurs de l'inflammation dans les vaisseaux par l'intermédiaire de différentes voies cellulaires et pourrait ainsi favoriser la rupture des plaques d'athérome (45). Des études observationnelles ont retrouvé une association positive

entre les estrogènes endogènes et la CRP (46, 47). Toutefois, l'implication des récepteurs ER dans cette relation est incertaine.

D'après ces données, les estrogènes apparaissent donc comme des biomarqueurs pouvant agir de manière complexe directe ou indirecte sur le développement des maladies artérielles ischémiques.

C. Maladies artérielles ischémiques chez les femmes ménopausées

1. Estrogènes et risque artériel ischémique

De nombreuses études expérimentales ont suggéré un rôle protecteur des estrogènes dans le développement de l'athérosclérose et de ses complications (44). Néanmoins, cette hypothèse n'a pas été confirmée par les essais américains WHI (Women's Health Initiative) menés sur le traitement hormonal de la ménopause (THM). Ces études ont montré une augmentation du risque d'AVC chez les femmes utilisant un THM ainsi qu'un effet différentiel des estrogènes sur le risque de cardiopathie ischémique en fonction de l'âge (« timing hypothesis »). Le THM pourrait être bénéfique à l'apparition de la ménopause, en freinant le développement des plaques d'athérome et néfaste ensuite, en favorisant leur rupture à un stade plus avancé. Les estrogènes exogènes pourraient ainsi jouer un rôle protecteur au début de la ménopause, puis délétère chez les femmes plus âgées (48, 49).

Après la ménopause, l'estradiol continue de circuler dans le plasma à des taux faibles mais variables d'une femme à l'autre. Cette variabilité a été rattachée à la survenue d'événements de santé suggérant un effet délétère des estrogènes. En effet, des études antérieures ont montré une augmentation du risque de cancer du sein (50), de démence (51, 52), de fragilité (53) et de mortalité toute cause (54) chez les femmes présentant des niveaux élevés d'estradiol. D'autre part, l'association entre les estrogènes endogènes et le risque cardiovasculaire a été peu étudiée mais les données antérieures ne plaident pas en faveur d'un effet cardioprotecteur. En effet, une relation positive a été retrouvée entre les estrogènes endogènes et le risque de cardiopathie ischémique (48, 55) et d'AVC (56). Toutefois, ces associations n'étaient pas indépendantes des facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels tels que l'obésité ou le diabète.

2. Polymorphisme des récepteurs des estrogènes et risque artériel ischémique

Compte tenu des associations potentielles entre les estrogènes et le risque cardiovasculaire, des recherches ont été effectuées sur le rôle des ER dans le développement des pathologies cardiovasculaires. Des études antérieures ont permis d'identifier des

polymorphismes génétiques *rs2234693* et *rs9340799* du récepteur ER α pouvant influencer l'expression d'*ESR1* (57) et jouer un rôle dans le développement des maladies artérielles ischémiques (40, 44, 58, 59). Cependant, une méta-analyse récente n'a pas permis de conclure à un lien entre ces polymorphismes et le risque de cardiopathie ischémique chez les femmes ménopausées (60). De plus, les données antérieures concernant l'impact de ces polymorphismes sur le risque d'AVC ont été discordantes (61, 62). Le récepteur ER β , découvert plus récemment, a été beaucoup moins étudié que ER α . Quelques investigations menées sur les polymorphismes génétiques *rs1256049*, *rs1271572* et *rs4986938* du récepteur ER β ont conduit à des résultats conflictuels (63, 64).

Malgré le rôle potentiel des estrogènes et de leurs récepteurs dans le développement des maladies artérielles ischémiques, l'influence des polymorphismes des ER sur l'association entre l'estradiol et le risque artériel ischémique n'a jamais été étudiée.

II. OBJECTIFS

L'objectif principal de ma thèse était d'évaluer la relation entre les estrogènes endogènes et le développement des maladies cardiovasculaires chez les femmes ménopausées.

Pour répondre à cette question de recherche, j'ai développé ce travail autour de trois axes à partir des données de la cohorte française des 3 Cités (3C) incluant 10.000 personnes âgées de plus de 65 ans :

- 1) Etude de la relation entre les estrogènes endogènes et la survenue de maladies artérielles ischémiques après 4 ans de surveillance

Nous avons évalué l'association entre les concentrations d'estradiol et le risque de cardiopathie ischémique et d'AVC ischémique chez les femmes ménopausées n'utilisant pas de traitement hormonal à partir d'une étude de type cas-cohorte.

- 2) Rôle des polymorphismes génétiques des récepteurs des estrogènes *ESR1* et *ESR2*

Nous avons approfondi l'étude de la relation entre l'estradiol et le risque artériel ischémique à 4 ans en évaluant le rôle modulateur des polymorphismes génétiques des récepteurs des estrogènes. Nous avons également recherché des mécanismes susceptibles d'expliquer nos résultats par des analyses complémentaires portant sur des marqueurs de l'inflammation et de l'hémostase.

- 3) Etude de la relation entre les estrogènes endogènes et la survenue de maladies cardiovasculaires à 10 ans

L'extension du suivi des sujets à 10 ans nous a permis d'étudier l'association entre les estrogènes endogènes et le risque cardiovasculaire à long terme dans l'échantillon aléatoire issu de l'étude cas-cohorte.

III. METHODES

A. Population et collection des données : l'étude des 3 Cités

1. Protocole de l'étude

L'étude des 3 Cités (3C) est une cohorte française prospective réalisée au sein de la population générale dont le principal objectif est d'évaluer le déclin cognitif lié aux facteurs de risque vasculaire chez les sujets âgés de plus de 65 ans (65). Cette étude multicentrique a été développée dans trois villes françaises : Bordeaux, Dijon et Montpellier. Le recrutement s'est effectué entre mars 1999 et mars 2001, par tirage au sort, à partir des listes électorales. Le nombre de sujets par ville a été déterminé de façon proportionnelle à la taille de la population de chacune d'entre elles. Pour être éligible, les sujets devaient être non institutionnalisés, âgés de plus de 65 ans et vivre dans l'une de ces trois villes ou leur banlieue. Toutes les personnes éligibles et leur conjoint ont reçu une lettre explicative de l'étude avec une invitation à y participer. En cas de non-réponse à cette première lettre, les sujets étaient contactés par téléphone. Par cette méthode, 9.693 sujets ont été sélectionnés, soit 37 % de la population éligible. Parmi eux, 7 étaient âgés de moins de 65 ans et 392 ont finalement refusé le questionnaire au moment de l'inclusion.

Au total, cette cohorte a inclus 9.294 individus âgés de 65 ans ou plus, dont 3.650 hommes et 5.644 femmes. Initialement, la durée de suivi de la cohorte était fixée à 4 ans mais des investigations complémentaires ont été réalisées à 10 ans pour la détection des événements cardiovasculaires, de la démence et de la mortalité. Des visites de suivi ont été réalisées à 2 ans, 4 ans, 6 ans et 10 ans à partir de la date d'inclusion.

Le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique du Centre Hospitalo-Universitaire de Bicêtre et un consentement a été signé par chaque participant.

2. Recueil des données

Les données pour chaque participant ont été recueillies à l'inclusion par un interrogatoire utilisant des questionnaires standardisés, réalisé en face à face avec une infirmière ou une psychologue. On dispose pour chaque sujet de données auto-rapportées sur les caractéristiques sociodémographiques, le mode de vie, la profession, l'éducation, les

antécédents et/ou facteurs de risque cardiovasculaire, les traitements reçus et les caractéristiques de la ménopause pour les femmes.

Les données recueillies sur les médicaments ont été vérifiées à partir des ordonnances pour environ la moitié des sujets et des données de la CNAM. Le codage des médicaments a été effectué à l'aide de la classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique (ATC) (66).

Les informations concernant les antécédents cardiovasculaires ont été validées par deux panels d'experts indépendants, un pour les maladies coronaires et un autre pour les AVC. Elles ont été complétées si nécessaire auprès du médecin traitant ou à partir des comptes-rendus hospitaliers.

A l'inclusion, tous les individus ont été soumis à un examen médical permettant les mesures anthropométriques suivantes : poids, taille, tour de taille et tour de hanche. Les pressions artérielles systoliques et diastoliques ont également été mesurées.

Des prélèvements sanguins effectués lors du recrutement ont pu être obtenus pour 90% des sujets. Ils ont permis de constituer une DNAtèque et une plasmathèque ayant notamment servi aux dosages de la glycémie et du cholestérol à jeun.

3. Facteurs de risque cardiovasculaire

A l'inclusion, les facteurs de risque cardiovasculaire ont été recherchés pour tous les sujets. L'hypertension artérielle a été définie comme une pression artérielle initiale supérieure ou égale à 140 mm Hg (systolique) et/ou 90 mm Hg (diastolique) et/ou la prise d'un traitement antihypertenseur. Les sujets étaient considérés diabétiques si la valeur de leur glycémie à jeun était supérieure ou égale à 1.26 g/L et/ou s'ils utilisaient un traitement antidiabétique. L'hypercholestérolémie était définie par un taux de cholestérol total à jeun supérieur à 2.40 g/L et/ou la prise d'un traitement hypolipémiant. L'indice de masse corporelle (IMC) a été calculé en divisant la taille (m) par le poids (kg) au carré. L'obésité correspondait à un IMC supérieur à 30 kg/m² selon la définition de l'OMS (67). Le rapport taille/hanche a également été calculé en divisant le tour de taille par le tour de hanche pour tous les sujets dont les données étaient disponibles. Enfin, le statut tabagique a été codé en trois catégories : jamais, ancien (arrêt du tabac depuis moins de 6 mois) ou actuel fumeur.

4. Définition et validation des cas

Les sujets ont été suivis initialement pendant 4 ans, avec un premier examen entre avril 2001 et décembre 2002 et un second examen entre 2003 et 2005. Durant cette période de surveillance, 135 cas incidents de maladie artérielle ischémique incluant les AVC et les cardiopathies ischémiques ont été identifiés chez les femmes. Le suivi a ensuite été poursuivi jusqu'à 10 ans et a permis d'enregistrer 276 cas supplémentaires. Tous ces événements ont été validés par un comité médical selon les définitions internationales, à partir des comptes-rendus hospitaliers et des dossiers médicaux.

Les cardiopathies ischémiques étaient définies par : une hospitalisation pour angor stable ou instable, ou une revascularisation coronarienne (pontage aorto-coronarien ou angioplastie), ou un IDM fatal ou non. L'angine de poitrine était définie par l'association d'une douleur thoracique à au moins un des critères suivants : sténose coronarienne supérieure à 50% à la coronographie ; épreuve d'effort positive ; scintigraphie myocardique positive ; anomalies de l'électrocardiogramme (ECG) sans preuve d'IDM ni connaissance d'une autre pathologie induisant ces modifications à l'ECG. L'IDM était défini par l'une des conditions suivantes : l'apparition d'une onde Q de nécrose ou tout autre signe d'ischémie récente sur l'ECG ; une douleur thoracique typique ou atypique accompagnée d'une nouvelle ischémie ou d'une aggravation d'une ischémie connue et d'une augmentation des enzymes cardiaques supérieure à deux fois la normale ; la preuve post mortem d'un IDM ou d'une thrombose récent. Les décès coronaires étaient définis à partir des certificats de décès selon la 10^{ème} édition de la Classification Internationale des Maladies (CIM 10) et incluaient les codes suivants : I219, I251 à I259, I461 et R960.

Les AVC ont également été validés par un comité médical selon la définition clinique internationale : brutal déficit neurologique focal confirmé par une lésion compatible sur l'IRM cérébrale. Dans notre analyse, nous nous sommes intéressés uniquement aux pathologies ischémiques et avons donc exclu les AVC de type hémorragique en raison de la physiopathologie très différente de ce type d'AVC.

La mortalité par cause cardiovasculaire a également été étudiée après 10 ans de suivi. Elle était définie à partir de la classification CIM 10 par les codes suivants : I00 à I99. Elle incluait notamment les décès par cardiopathie ischémique, AVC et insuffisance cardiaque.

B. Etude cas-cohorte

Décrit initialement par Prentice en 1986, le schéma cas-cohorte a été utilisé dans notre étude pour des raisons pratiques et économiques (68). Cette méthodologie consiste à utiliser tous les cas incidents de la cohorte et à les comparer à un échantillon aléatoire de sujets témoins. Nous avons ainsi pu travailler sur un nombre réduit de sujets tout en conservant les avantages d'une étude de cohorte. Contrairement à une étude cas-témoins nichée dans une cohorte, l'approche cas-cohorte permet d'utiliser le même groupe de témoins pour plusieurs types d'événements incidents et d'incrémenter des cas incidents supplémentaires sans devoir modifier le nombre de témoins. On minimise ainsi le nombre de dosages hormonaux effectués à partir de la plasmathèque, en les réalisant uniquement chez les sujets de la sous-cohorte et les cas additionnels. Cette approche est de plus en plus utilisée dans les études épidémiologiques sur les biomarqueurs (69-72).

En pratique, nous avons réalisé un tirage au sort au sein de la cohorte entière (Figure 7) et obtenu un échantillon (représentant ici $1/7^{\text{ème}}$ de la cohorte) appelé « sous-cohorte » comprenant 1.254 sujets dont 759 femmes. Les femmes prenant des traitements hormonaux susceptibles de modifier la concentration plasmatique ou l'effet de l'estradiol ont été exclues, notamment celles utilisant un THM ou un modulateur sélectif des récepteurs des estrogènes (SERM) ou une anti-aromatase ($n=116$). De plus, nous avons exclu les femmes pour lesquelles les taux de testostérone (T) et/ou d'estradiol étaient anormalement élevés après la ménopause ($E2 > 40$ pg/ml et/ou $T > 3$ ng/mL) ($n=4$). Afin d'étudier le risque de premier événement, les sujets avec un antécédent personnel d'AVC et/ou de cardiopathies ischémiques à l'inclusion ($n=86$) ont été exclus. Enfin, après l'exclusion des perdus de vue ($n=16$), la sous-cohorte comprenait 537 femmes incluant 15 cas incidents de maladie artérielle ischémique et 522 non-cas. Dans le groupe de femmes non incluses dans la sous-cohorte ($n=4.885$), nous avons conservé uniquement les cas incidents de maladie artérielle ischémique survenus durant les quatre années de suivi ($n=110$), après l'exclusion des non-cas ($n=4.750$) et des cas incidents d'AVC hémorragique ($n=7$). Puis, une cascade d'exclusions identique à celle effectuée pour la sous-cohorte a sélectionné 91 cas incidents additionnels de maladie artérielle ischémique. Enfin, ces cas incidents additionnels ont été rajoutés à la sous-cohorte

afin de constituer l'échantillon cas-cohorte, composé de 522 non-cas et 106 cas incidents, incluant 67 cardiopathies ischémiques et 39 AVC ischémiques.

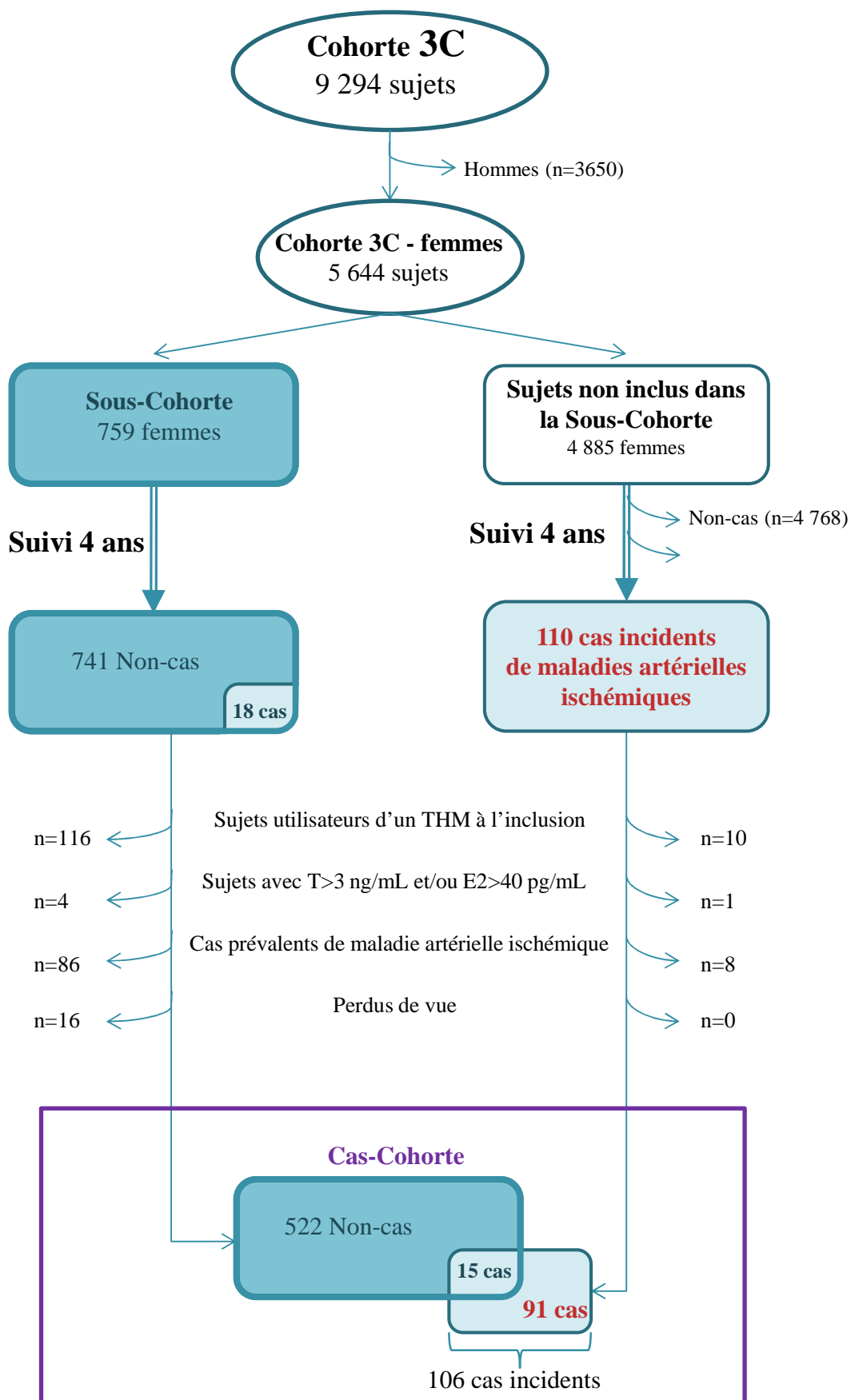


Figure 7. Echantillonnage de l'étude cas-cohorte

Dans l'analyse concernant les polymorphismes des récepteurs des estrogènes, les données génétiques n'étaient pas disponibles pour 5 sujets. Ainsi, l'échantillon cas-cohorte incluait 623 femmes ménopausées, dont 105 cas incidents de maladie artérielle ischémique.

Enfin, nous avons utilisé la sous-cohorte pour étudier le risque cardiovasculaire (cardiopathies ischémiques, AVC et décès cardiovasculaires) après 10 ans de suivi. Dans cette analyse, les cas prévalents de maladies artérielles ischémiques n'ont pas été exclus afin d'assurer une puissance statistique suffisante. Néanmoins, cette variable a été prise en compte dans notre modèle statistique. A partir de la sous-cohorte incluant 759 femmes, nous avons exclu les utilisatrices d'un traitement hormonal à l'inclusion (n=116), celles avec des taux élevés d'estradiol ou de testostérone (n=4) et les perdues de vue à 10 ans (n=18). Ainsi, notre échantillon d'étude après 10 ans de suivi comprenait 621 femmes dont 69 cas incidents de maladies cardiovasculaires, incluant notamment 30 cardiopathies ischémiques non fatals, 14 AVC non fatals et 25 décès cardiovasculaires.

C. Mesure des paramètres biologiques et génétiques

A l'inclusion, un prélèvement sanguin a été réalisé chez plus de 90% des sujets de toute la cohorte. Des échantillons de plasma prélevé sur EDTA étaient disponibles pour tous les sujets de l'étude cas-cohorte. Ils ont été obtenus par centrifugation (1000 g à 4°C pendant 15 min) et immédiatement congelés à -80°C dans des tubes en plastique de 1mL.

1. Mesure des hormones sexuelles

Ce travail de thèse s'est concentré sur les estrogènes endogènes, particulièrement l'estradiol considéré comme variable d'intérêt principal. La testostérone, précurseur de l'estradiol a été étudiée comme covariable.

a) Dosage de l'estradiol

Différentes méthodes de dosage existent pour mesurer les taux plasmatiques d'estradiol. La méthode de référence dite « gold standard » est la spectrométrie de masse couplée ou non à la chromatographie en phase liquide (LC-MS) ou gazeuse (GC-MS). La GC-MS a été développée pour l'analyse des hormones stéroïdes dans les années 1960 par l'équipe de Sjöval (73). La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer les métabolites dans une colonne par une technique de vaporisation du mélange à analyser. Après séparation, les analytes sont directement introduits dans le spectromètre de masse qui détecte et détermine la structure des composants après ionisation. L'association de ces deux techniques permet d'obtenir une meilleure identification des molécules et d'augmenter la sensibilité et spécificité du dosage des hormones stéroïdes. Néanmoins, ces méthodes très complexes et coûteuses nécessitent du temps rendant leur utilisation courante difficile en pratique courante. D'autres procédés pour mesurer les hormones stéroïdes ont été développés, notamment les techniques radio-immunologiques. Ces méthodes consistent à fixer par compétition un anticorps radioactif à l'antigène d'intérêt puis à détecter les complexes antigènes-anticorps. La première

méthode décrite par Abraham en 1969 (74) appelée RIA (Radioimmunoassay) conventionnelle ou indirecte consiste en une extraction par un solvant organique, une purification par chromatographie suivies d'une méthode de quantification par RIA. Puis, une autre technique plus rapide appelée RIA directe s'est développée sans étape préalable d'extraction ou de purification par chromatographie. Cette dernière méthode a l'avantage d'être simple, rapide, relativement peu coûteuse et requière un faible volume de plasma (0.1 mL). Cependant, elle peut surestimer la mesure de l'estradiol par manque de spécificité de l'anticorps utilisé, notamment chez les femmes utilisant un traitement hormonal de la ménopause (75). De plus, l'absence d'étape de purification pourrait conduire à une séparation insuffisante de l'estradiol avec la SHBG, à qui il est lié avec une forte affinité. Un manque de sensibilité a également été décrit pour mesurer les faibles taux d'estradiol (75).

Dans notre étude, le 17 β -estradiol total a été mesuré par dosage RIA direct à l'aide de kits (Spectria RIA) commercialisés par la société Orion Diagnostica. La limite de quantification, c'est-à-dire la valeur minimale d'estradiol pour laquelle le coefficient de variation est inférieur à 20 % était de 2 pg/mL (7.3pmol/L) et correspondait à la limite de détection. Une valeur de 0.6 pg/ml a été attribuée arbitrairement aux sujets présentant des taux inférieurs à la limite de détection (n=39). Les coefficients de variation intra et inter-dosage étaient respectivement de 17.6% et 18.1% pour des concentrations de 3.2 pg/mL (12 pmol/L) et de 2.8% et 5.8% respectivement pour des concentrations de 24 pg/mL (88 pmol/L).

Le 17 β -estradiol biodisponible a été mesuré par précipitation différentielle des hormones liées aux protéines transporteuses puis RIA. Il représente la partie de l'E2 total non liée à la SHBG, supposée active.

b) Dosage des autres hormones sexuelles

La testostérone totale a été mesurée par une méthode RIA similaire à celle utilisée pour l'estradiol total. La limite de détection était 0.02 ng/mL. Les coefficients de variation intra et inter-dosages étaient de 7.5 % et 7.0 % respectivement pour des concentrations de 0.46 et 0.31 ng/mL.

2. Mesure des autres paramètres biologiques

a) Lipides plasmatiques et glycémie

Les mesures lipidiques et la glycémie ont été réalisées de manière centralisée au laboratoire de biochimie du Centre Hospitalier Universitaire de Dijon. Les paramètres lipidiques incluaient le cholestérol total, le LDL-cholestérol, le HDL-cholestérol et les triglycérides. Le LDL-cholestérol a été déterminé à partir du cholestérol total, du HDL-cholestérol et des triglycérides d'après la formule de Friedewald (76). Elle n'est applicable que si le taux de triglycérides est inférieur à 4.5 g/L (5.08 mmol/L).

b) Paramètres de l'hémostase et de l'inflammation

Le fibrinogène est une protéine plasmatique synthétisée par le foie. Sous l'action de la thrombine, il se transforme en fibrine pour permettre la coagulation sanguine. Son dosage a été réalisé par une technique de coagulation selon la méthode de Clauss (Dade Behring). Cette méthode consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma, proportionnel à la concentration de fibrinogène, en présence d'un excès de thrombine. Ensuite, la valeur du fibrinogène en g/L est déterminée en fonction du temps de coagulation à l'aide d'une courbe d'étalonnage. Une augmentation du taux de fibrinogène (supérieur à 4 g/L) est considérée comme le reflet d'une hypercoagulabilité et/ou d'une inflammation.

Le facteur von Willebrand (FvW) est l'un des principaux acteurs de l'hémostase primaire par son rôle d'activateur de plaquettes et de transport du facteur XIII. Les D-dimères sont les produits de dégradation de la fibrine lors du processus de fibrinolyse. Leur quantité dans le sang augmente en cas d'activation de la coagulation et de la fibrinolyse. Ces deux marqueurs, le FvW et les D-dimères, ont été mesurés par des méthodes immuno-enzymatiques de type ELISA. La quantité de FvW est exprimée en pourcentage par rapport à un plasma normal de référence et les D-dimères en µg/L.

Le test de génération de thrombine (TGT) in vitro a été réalisé par une technique fluorimétrique automatisée, conduisant à un thrombogramme. Les variables que nous avons

choisies d'utiliser étaient la quantité totale de thrombine générée, notée ETP (Endogenous Thrombin Potential) et la quantité maximale de thrombine générée, représentées respectivement sur le thrombogramme par l'aire sous la courbe et la hauteur du pic. Ces méthodes ont été décrites (31, 53, 72, 77). Un ETP ou un pic élevé correspondent à une hypercoagulabilité.

Enfin, la hs-CRP (« High-sensitivity » CRP ou CRP ultra-sensible) a été mesurée par un dosage immunologique turbidimétrique. La limite de détection et le coefficient de variation inter-essai étaient respectivement de 0.15 mg/L et 2.6%. Sa concentration est augmentée en cas d'inflammation systémique.

Pour minimiser la variabilité analytique, toutes les mesures biologiques ont été réalisées en séries dans un même laboratoire appliquant un contrôle de qualité strict (Service de Génétique moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie du Pr Mantel à l'Hôpital de Bicêtre et Service d'hématologie du Pr Gaussem à l'Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP)).

3. Géotypage des polymorphismes des ER

L'ADN a été extrait à partir des noyaux de globules blancs (Puregene Kit, Qiagen, France), puis congelé à -80°C. Le géotypage des polymorphismes des ER a été effectué selon une méthode automatisée (KASPar) développée par la société Kbiosciences (Hoddesdon Herts, Royaume-Uni), utilisant une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) compétitive et allèle-spécifique. Ce procédé consiste en une dénaturation de l'ADN, puis une amplification de la région d'ADN contenant le polymorphisme nucléotidique (SNP « single-nucleotide polymorphisms ») et enfin une hybridation des fragments d'ADN amplifiés à l'aide d'une sonde marquée par fluorescence. Les résultats ont été interprétés grâce au logiciel KlusterCaller 1.1. L'erreur de mesure du système KASPar était inférieure à 0.3%. Les deux principaux polymorphismes d'*ESR1* ont été recherchés : *rs2234693* et *rs9340799* (nommés également *PvuII* et *XbaI* ou encore *IVS1-401* et *IVS1-354*), situés respectivement aux positions 397 et 351 de l'intron 1 (figure 4). Trois polymorphismes d'*ESR2* ont été analysés : *rs1256049* (nommé également *RsaI*), *rs4986938* (nommé également *AluI*) et *rs1271572*, situés respectivement aux positions 1082 de l'exon 5, 1730 de la région non traduite 3'UTR (« Untranslated ») de l'exon 8 et dans le promoteur. La sélection de ces polymorphismes était

justifiée par les données antérieures montrant une association entre ces polymorphismes et le risque de cardiopathie ischémique ou d'AVC (60, 62, 63) avec une possible fonctionnalité (41, 78, 79).

D. Analyses statistiques

Les analyses statistiques concernant la description de la population, les déterminants de l'estradiol et les fréquences génotypiques ont été réalisées au sein de la sous-cohorte. Le schéma d'étude cas-cohorte ne semblait pas adapté en raison de la présence des cas incidents additionnels qui n'ont pas été sélectionnés de manière aléatoire comme les sujets de la sous-cohorte. Ainsi, la restriction de ces analyses à la sous-cohorte a permis de limiter les biais dans la mesure des associations.

L'association entre l'estradiol et le risque artériel ischémique a été analysée à partir de l'étude cas-cohorte. Néanmoins, pour l'analyse de l'incidence des maladies cardiovasculaires après 10 ans de suivi, nous avons utilisé la sous-cohorte en raison de l'absence de dosage de l'estradiol parmi les cas additionnels survenus entre 4 et 10 ans.

1. Analyse descriptive

Nous avons analysé les données de base des femmes à l'inclusion, notamment leur répartition au sein des centres, les caractéristiques de la ménopause, les facteurs de risque cardiovasculaire et les paramètres biologiques. Ces données ont été comparées entre la sous-cohorte et la cohorte restante, afin de vérifier la bonne représentativité de l'échantillon. Les tests du Chi² et de Student ont été utilisés respectivement pour les variables catégorielles et continues. Les résultats sont présentés par la fréquence pour les variables catégorielles et par la moyenne arithmétique et l'écart-type pour les variables continues. Une transformation logarithmique a été nécessaire pour normaliser certaines variables notamment la CRP et le facteur von Willebrand. Nous présentons ainsi la moyenne géométrique accompagnée des interquartiles pour ces variables.

2. Distribution et déterminants des hormones sexuelles

La distribution du 17 β -estradiol et de la testostérone des femmes incluses dans la sous-cohorte a été représentée sous la forme d'un histogramme. Cela nous a permis de tester graphiquement la normalité de ces variables et de vérifier que les valeurs observées étaient compatibles avec la ménopause (47, 80, 81). Une transformation logarithmique a été nécessaire pour normaliser ces variables.

Les niveaux moyens de l'estradiol et de la testostérone ont été calculés pour chaque caractéristique à l'inclusion. Les relations entre les hormones sexuelles et les paramètres biologiques ont été recherchées en estimant les coefficients de corrélations de Spearman dans la sous-cohorte.

L'association entre l'estradiol et les caractéristiques des sujets à l'inclusion a été étudiée de façon univariée, à l'aide d'une analyse de variance puis multivariée par régression linéaire multiple. Nous avons construit le modèle multivarié en prenant en compte toutes les variables significatives ($p < 0.15$) lors de l'analyse univariée. Pour assurer la comparabilité des résultats, nous présentons les coefficients de régression standardisés, correspondant à la variation de la variable d'intérêt pour un écart-type de la variable explicative. Ces coefficients sont également ajustés sur les autres facteurs.

3. Polymorphismes génétiques des ER

Pour chaque polymorphisme recherché, l'équilibre de Hardy-Weinberg a été vérifié. Il s'agit d'un modèle génétique dérivant des lois de Mendel et stipulant la stabilité des fréquences génotypiques au fil des générations dans une très grande population, sans migration, ni mutation, ni sélection naturelle et où les unions entre les sujets se font au hasard. Connaissant les fréquences alléliques de ces polymorphismes, on s'attend à observer certaines fréquences génotypiques dans la population. Pour tester cette hypothèse, les fréquences génotypiques observées dans la sous-cohorte ont été comparées aux fréquences théoriques par des tests du Chi². Pour chaque polymorphisme des ER, un tableau présente ainsi les fréquences alléliques et génotypiques observées, associées aux résultats du test de l'équilibre de Hardy Weinberg.

La relation entre les différents polymorphismes a été étudiée en recherchant un déséquilibre de liaison. Il existe un déséquilibre de liaison lorsque la probabilité d'observer un couple d'allèles sur un chromosome n'est pas égale au produit des probabilités d'observer ces allèles individuellement, c'est-à-dire lorsqu'il y a association préférentielle de ces deux allèles. La relation entre tous les polymorphismes des ER a donc été analysée deux à deux dans la sous-cohorte, en estimant le coefficient de corrélation r^2 correspondant au coefficient de déséquilibre de liaison (D') (82), à l'aide du logiciel Thesias (83).

L'association entre les différents polymorphismes et les taux d'estradiol a été testée en comparant les moyennes d'estradiol pour chaque génotype par une analyse de variances ajustée sur le centre et l'IMC. La prise en compte de l'obésité dans cette analyse était justifiée par le rôle déterminant de cette variable sur les taux d'estradiol.

4. Facteurs de risque cardiovasculaire

Afin de valider nos données, l'association entre les différents facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels (âge, obésité, tabagisme, hypercholestérolémie, hypertension artérielle et diabète) et le risque artériel ischémique a été testée parmi 623 femmes de l'étude cas-cohorte. Les cas incidents de maladie artérielle ischémique ont ainsi été comparés aux non-cas en fonction des niveaux de chaque caractéristique à l'inclusion. Ces associations ont été testées par des tests du χ^2 pour les variables catégorielles et des tests de Student pour les variables continues.

Les paramètres biologiques, les marqueurs de l'hémostase et la CRP ont été également comparés entre les cas de maladie artérielle ischémique et les non-cas par des tests de Student.

5. Estrogènes et risque artériel ischémique

Dans une première étape, les moyennes des hormones sexuelles entre les cas de maladies artérielles ischémiques et les non-cas ont été comparées par une analyse de variance. Puis, le modèle de Cox a été choisi pour tenir compte du temps dans le suivi des sujets. Cette méthode permet d'exprimer le risque instantané de survenue d'un événement en fonction de l'effet de plusieurs variables. Ce modèle nous a permis notamment d'évaluer la valeur prédictive de

chaque variable d'intérêt en tenant compte des facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels.

a) Caractéristiques du modèle de Cox

Le modèle de Cox exprime la fonction de risque instantané de l'individu i en fonction de p variables explicatives $Z_i = (Z_{i1}, Z_{i2}, \dots, Z_{ip})$ sous une forme multiplicative, c'est-à-dire comme le produit d'une fonction de risque de base commune à tous les individus $\lambda_0(t)$ et de l'effet de p variables explicatives $\exp(\sum \beta_i Z_i)$:

$$\lambda(t) = \lambda_0(t) \exp(\sum \beta_i Z_i) \text{ où } \beta_i \text{ sont les paramètres à estimer}$$

La fonction de risque $\lambda(t)$ représente la probabilité d'apparition de l'événement dans un intervalle de temps $[t, t + \Delta t]$ sachant que l'événement ne s'est pas réalisé avant l'instant t .

Le rapport des risques instantanés pour deux sujets i et j ayant des caractéristiques Z_i et Z_j est :

$$\frac{\lambda(t_i; Z_i)}{\lambda(t_j; Z_j)} = \frac{\lambda_0(t) \exp(\sum \beta_i Z_i)}{\lambda_0(t) \exp(\sum \beta_j Z_j)} = \frac{\exp(\sum \beta_i Z_i)}{\exp(\sum \beta_j Z_j)}$$

Ce rapport proportionnel ne dépend pas du temps. Il s'exprime en hazard ratio (HR). L'hypothèse des hazards proportionnels caractérisée par la constance du rapport des risques instantanés avec le temps est nécessaire à la validité du modèle de Cox. Cette hypothèse était bien vérifiée dans nos modèles.

Les coefficients β_i représentent l'effet de la caractéristique Z_i . S'il est nul, cette variable n'a pas d'influence sur l'événement considéré. Le principe du modèle de Cox est d'estimer ces coefficients afin d'exprimer l'effet de certaines variables d'intérêt sur la survenue d'un événement. Les estimateurs des β_i sont obtenus par la méthode du maximum de vraisemblance.

La probabilité de survenue d'un événement en t_i , c'est-à-dire dans l'intervalle de temps $[t_i, t_i + \Delta t_i]$ est :

$$\sum_{j \in R(t_i)} \lambda_0(t) \exp(\sum \beta_j Z_j)$$

Où $R(t_i)$ est l'ensemble des individus encore à risque juste avant l'instant t_i .

La probabilité pour qu'un sujet i ait un événement en t_i sachant qu'il est à risque à t_i et qu'il n'y a qu'un seul événement en t_i parmi les sujets à risque à t_i , vaut :

$$\frac{\exp(\sum \beta_i Z_i)}{\sum_{j \in R(t_i)} \exp(\sum \beta_j Z_j)}$$

Où le dénominateur représente la somme des contributions des sujets à risque au temps i .

Cette probabilité dépend uniquement du paramètre β . A chaque événement, le nombre de sujets à risque diminue au dénominateur. La vraisemblance partielle se définit comme le produit des probabilités conditionnelles sur les temps des événements. Elle s'exprime selon la méthode du maximum de vraisemblance comme :

$$L = \prod_{i=1}^D \frac{\exp(\sum \beta_i Z_i)}{\sum_{j \in R(t_i)} \exp(\sum \beta_j Z_j)}$$

Où D est le nombre d'événements observés.

Une adaptation au schéma cas-cohorte était nécessaire pour utiliser le modèle de Cox. Trois méthodes différentes ont été décrites dans la littérature (68, 84, 85) et nous avons choisi celle proposée par Barlow en 1994. Toutes ces méthodes consistent à attribuer une pondération différente aux sujets issus de la sous-cohorte et aux cas incidents rajoutés de la cohorte initiale. Ainsi, un cas additionnel n'appartenant pas à la sous-cohorte n'est considéré à risque qu'à l'instant t de son événement et il est inclus dans le modèle seulement à ce moment avec une pondération différente des sujets issus de la sous-cohorte. De plus, chaque

événement contribue de manière égale selon qu'il est issu ou non de la sous-cohorte. Après application de cette méthode, la vraisemblance partielle du modèle de Cox s'écrit alors :

$$\frac{\exp(\sum \beta_i Z_i)}{w_i \exp(\sum \beta_i Z_i) + \sum_{j \in S} w_j \exp(\sum \beta_j Z_j)}$$

Où w_i est le poids attribué au sujet i au temps t_i . Le dénominateur représente la somme de la contribution du sujet ayant fait l'événement et de l'ensemble des sujets inclus dans la sous-cohorte S . Ainsi, les cas extérieurs à l'échantillon aléatoire contribuent comme individus à risque seulement à partir de l'instant t_i de leur événement et leur poids est égal à 0 avant t_i . Dans la méthode de Barlow, la pondération d'un cas est toujours égale à 1. Les non-cas de la sous-cohorte sont pondérés par l'inverse de la fraction d'échantillonnage α , c'est-à-dire $w=1/\alpha$. Dans notre étude, la sous-cohorte représente environ 1/7^{ème} de la cohorte initiale, soit $\alpha=0.15$. Ainsi, un sujet de la sous-cohorte a un poids $w=1/0.15$ tant que l'événement n'a pas eu lieu. Si ce sujet a un événement, son poids devient alors égal 1 au moment t_i de l'événement (figure 8).

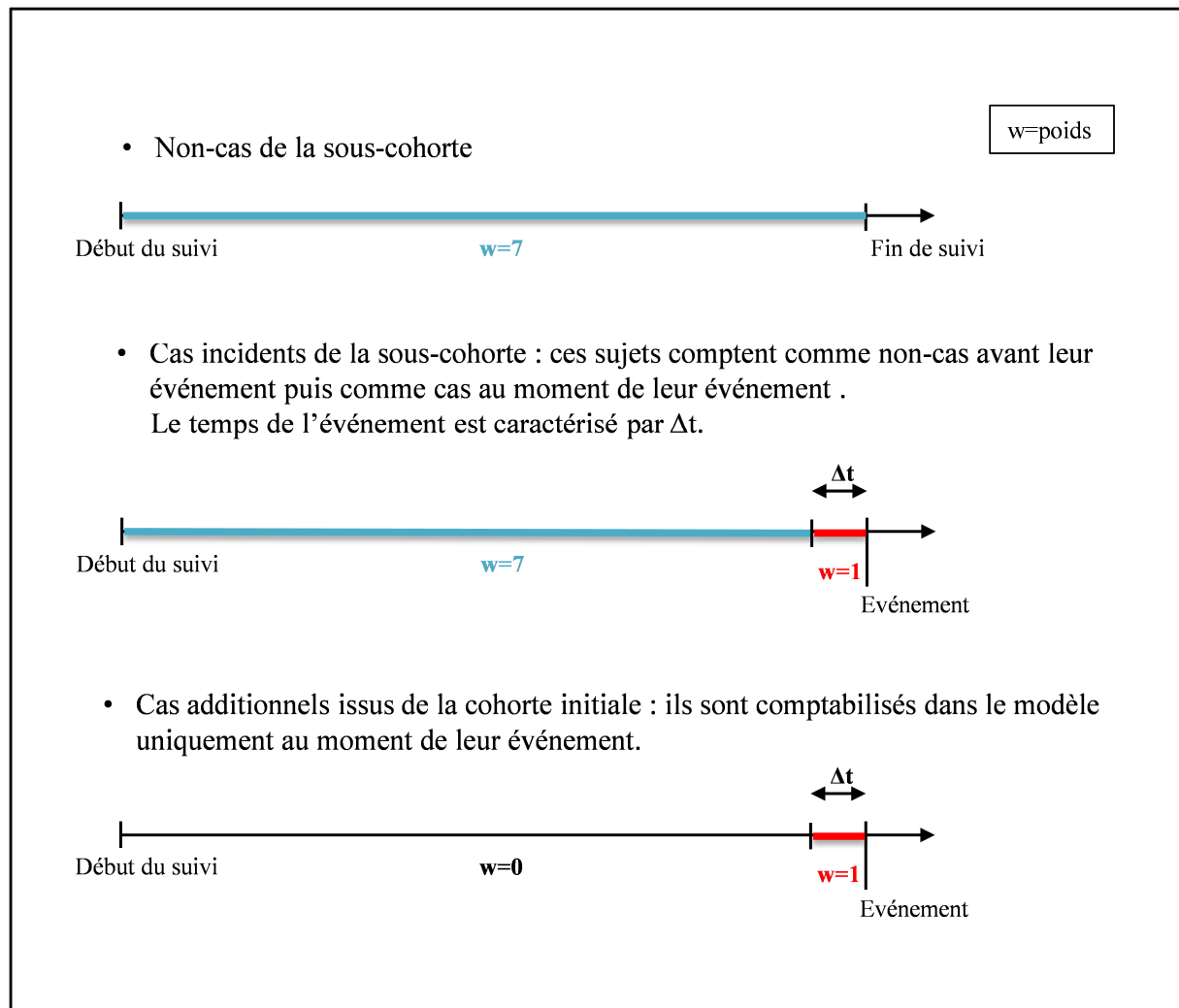


Figure 8. Pondérations des différents sujets dans le modèle de Cox adapté à une étude cas-cohorte

Habituellement, l'échelle de temps utilisée dans le modèle de Cox est le délai de suivi des sujets, correspondant à la période entre l'inclusion et la date de l'événement ou de censure. Cependant, dans les études épidémiologiques où le risque de maladie est fortement lié à l'âge, il est fortement recommandé d'utiliser l'âge comme échelle de temps au lieu du délai de suivi (86-88). Cette procédure permet de s'affranchir de la nature du lien entre l'âge et la survenue d'un événement. Ainsi, on suppose que les sujets sont suivis depuis leur naissance et chaque cas est comparé à un individu à risque du même âge. L'utilisation de cette méthode implique une entrée retardée avec une troncature à gauche survenant à l'âge de l'inclusion (en l'absence de données avant la date du recrutement). Elle n'est applicable que si l'âge de survenue de l'événement est indépendant de l'âge à l'inclusion, c'est-à-dire si le risque de la maladie d'intérêt d'un sujet n'est pas modifié par son entrée dans la cohorte. L'expression de

ce modèle est similaire au modèle de Cox habituel, avec une censure à droite qui est commune aux deux types d'échelles de temps. De plus, ce type de modèle nous permet d'interpréter directement la fonction de risque comme une fonction d'incidence âge-spécifique. Le risque artériel ischémique étant connu pour être fortement associé à l'âge, nous avons donc utilisé l'âge comme échelle de temps.

Nous avons comparé ces différentes modalités d'utilisation du modèle de Cox dans l'étude de l'association entre le risque artériel ischémique et l'estradiol au sein de l'étude cas-cohorte. Les HR obtenus avec différents modèles (le premier ajusté sur l'âge avec le délai de suivi comme échelle de temps et le deuxième avec l'âge pour échelle de temps) étaient similaires. Ce résultat montre l'équivalence des deux stratégies dans l'analyse de cette variable d'intérêt et s'explique vraisemblablement par l'absence de lien entre l'estradiol plasmatique et l'âge. Par ailleurs, nous avons observé que les estimations des Hazard Ratios et leur intervalle de confiance étaient peu modifiés au sein de l'étude cas-cohorte en utilisant la méthode de Barlow adaptée à ce schéma d'étude. Ce résultat montre l'impact limité des pondérations lorsque l'incidence de la maladie est faible.

b) Mise en œuvre du modèle de Cox

Pour tester la relation entre le risque artériel ischémique et les hormones sexuelles endogènes, les HR et leur intervalle de confiance à 95% (IC 95%) ont été estimés dans des modèles continus et les variations du risque sont exprimées pour une augmentation d'un écart-type du log de la variable explicative. Le risque artériel ischémique a également été étudié en fonction des hormones sexuelles endogènes exprimées en quartiles ou tertiles. Le groupe correspondant au plus bas quartile ou tertile a été choisi comme référence. Un écart à la linéarité dans la relation entre le risque artériel ischémique et les hormones sexuelles endogènes a été systématiquement testé. Les HR ont été estimés à partir d'un premier modèle ajusté sur l'âge puis d'un deuxième modèle ajusté sur les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels tels que l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, le diabète, l'obésité et le tabac. Enfin, nous avons utilisé le rapport taille/hanche dans un modèle d'ajustement final. L'absence d'interaction entre les hormones sexuelles endogènes et les variables d'ajustement

a été vérifiée. De plus, afin de vérifier l'homogénéité des résultats, nous avons effectué des analyses stratifiées en fonction des niveaux de facteurs de risque des sujets à l'inclusion.

Les données sur l'IMC et le rapport taille/hanche n'étaient pas disponibles pour 1% et 9% des sujets respectivement. L'adiposité pouvant influencer le risque artériel ischémique et les niveaux d'estradiol, une imputation multiple a été réalisée pour ces données manquantes. Le modèle de prédiction avec imputation multiple incluait toutes les variables d'ajustement. Cinq séries de données imputées ont été créées et analysées. Les résultats ont été combinés selon la méthode de Rubin (89).

Des analyses de sensibilité ont été réalisées afin de vérifier la stabilité des résultats:

- En excluant les anciennes utilisatrices de THM, dans l'hypothèse d'un effet délétère de ce traitement sur le risque artériel ischémique même après son arrêt ;
- En excluant les utilisatrices récentes de THM, c'est-à-dire celles qui ont arrêté leur traitement moins d'un an avant leur inclusion, selon la même hypothèse que précédemment ;
- En excluant les sujets ayant pris un THM pendant leur suivi (n=3), dans l'hypothèse d'une modification de leur risque cardiovasculaire avec ce traitement.

D'autres analyses de sensibilité ont été réalisées, en excluant notamment les cas prévalents ou incidents de démence et les événements cardiovasculaires survenant la première année de suivi.

L'association entre des polymorphismes génétiques des estrogènes et le risque artériel ischémique a ensuite été étudiée en estimant les HR pour chaque génotype. Les modèles génétiques récessifs et dominants ont été examinés pour chaque polymorphisme afin de déterminer le meilleur modèle. Les résultats finaux sont ainsi présentés selon un modèle dominant avec une variable génotypique en deux catégories pour chaque polymorphisme. Enfin, l'association entre l'estradiol et le risque artériel ischémique en fonction de chaque génotype a été testée en réalisant une analyse stratifiée par polymorphisme avec la recherche d'une interaction entre l'estradiol et le génotype. Dans ce dernier modèle, le seuil de significativité a été corrigé par la méthode de Bonferroni qui tient compte des tests multiples non indépendants se rapportant aux 5 polymorphismes étudiés.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué un ajustement additionnel sur les paramètres de l'hémostase et de l'inflammation, incluant notamment le fibrinogène, le facteur von Willebrand, les D-dimères, la génération de thrombine et la CRP, afin d'évaluer l'excès de risque expliqué par ces variables. A noter, les données de ces variables étaient manquantes pour 25 sujets et les sujets prenant des anticoagulants (n=13) ont été exclus de cette analyse.

Toutes les analyses ont également été stratifiées par type d'événement (cardiopathies ischémiques et AVC) en ne considérant que le premier événement. Ainsi, l'échantillonnage cas-cohorte a été de nouveau réalisé pour chaque événement en utilisant la même cascade d'exclusions que pour l'étude des maladies artérielles ischémiques. Le risque de cardiopathie ischémique a été évalué parmi 549 non-cas et 70 cas incidents. De façon similaire, le risque d'AVC ischémique a été estimé à partir d'une population incluant 584 non-cas et 43 cas incidents.

Enfin, pour évaluer le risque cardiovasculaire à 10 ans en fonction des hormones sexuelles endogènes, le modèle de Cox a été utilisé dans la sous-cohorte. Les événements cardiovasculaires étudiés étaient les cardiopathies ischémiques, AVC et décès cardiovasculaires. Des analyses séparées par type d'événement ont été également réalisées.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SAS Statistical Software version 9.2.

IV. RESULTATS

A. Caractéristiques des sujets à l'inclusion

La cohorte entière inclut 5.644 femmes dont 759 appartiennent à la sous-cohorte. Le tableau 1 représente les caractéristiques des femmes à l'inclusion dans la cohorte 3C et dans la sous-cohorte. Globalement, les femmes étaient en moyenne âgées de 74 ans et légèrement en surpoids avec un IMC moyen de 25.3 kg/m². Elles étaient le plus souvent hypertendues (74%) et dyslipidémiques (64%). Une faible proportion était diabétique (8%) et avait des antécédents personnels de maladie artérielle ischémique (9% et 3% pour les cardiopathies ischémiques et AVC respectivement). La ménopause était naturelle pour 80% des femmes et un tiers d'entre elles environ était utilisatrice ancienne ou actuelle de THM. Enfin, ces femmes avaient plutôt un profil androïde avec un rapport taille/hanche en moyenne supérieur à 0,80. Comme attendu, aucune différence significative n'a été observée entre les femmes appartenant à la sous-cohorte et les autres.

Tableau 1. Caractéristiques des femmes à l'inclusion dans la cohorte 3C et la sous-cohorte

	Cohorte 3C		Sous-cohorte		Cohorte restante		p ^Δ
	(n=5 644)		(n=759)		(n=4 885)		
Age, moyenne (sd), années	74.4	(5.6)	74.1	(5.5)	74.5	(5.7)	0.12
Centre, n (%)							0.63
Bordeaux	1288	(22.8)	165	(21.7)	1123	(23.0)	
Dijon	3043	(53.9)	409	(53.9)	2634	(53.9)	
Montpellier	1313	(23.3)	185	(24.4)	1128	(23.1)	
IMC*, moyenne (sd), kg/m²	25.3	(4.4)	25.5	(4.5)	25.3	(4.4)	0.39
Rapport Taille/Hanche*, MG (IQR)	0.83	(0.79-0.87)	0.83	(0.79-0.88)	0.83	(0.79-0.87)	0.84
Diabète*, n (%)	426	(8.1)	58	(7.7)	368	(8.1)	0.70
Hypertension artérielle, n (%)	4212	(74.7)	571	(75.2)	3641	(74.6)	0.73
Hypercholestérolémie, n (%)	3463	(64.6)	469	(61.8)	2994	(65.0)	0.09
Cholestérol total, MG (IQR), g/L	2.29	(2.06-2.56)	2.30	(2.05-2.58)	2.29	(2.07-2.55)	0.69
LDL cholestérol, MG (IQR), g/L	1.40	(1.20-1.65)	1.40	(1.21-1.65)	1.40	(1.20-1.65)	0.83
HDL cholestérol, MG (IQR), g/L	0.65	(0.56-0.76)	0.65	(0.56-0.75)	0.65	(0.56-0.77)	0.55
Triglycérides, MG (IQR), g/L	1.12	(0.85-1.45)	1.14	(0.84-1.48)	1.12	(0.85-1.45)	0.20
Statut tabagique, n (%)							
Jamais	4593	(81.4)	613	(80.8)	3980	(81.5)	0.85
Ancien	827	(14.7)	114	(15.0)	713	(14.6)	
Actuel	221	(3.9)	32	(4.2)	189	(3.9)	
Antécédent de maladie artérielle ischémique							
Maladie coronarienne, n (%)	91	(9.2)	67	(8.8)	24	(10.4)	0.48
AVC, n (%)	202	(3.6)	26	(3.5)	176	(3.7)	0.80
Age de la ménopause, moyenne (sd), années	49.3	(5.6)	49.4	(5.7)	49.2	(5.5)	0.40
Type de ménopause, n (%)							
Naturelle	4416	(79.1)	600	(79.8)	3816	(79.0)	0.89
Chirurgicale	442	(7.9)	57	(7.6)	385	(8.0)	
Autre	723	(13.0)	95	(12.6)	628	(13.0)	
THM, n (%)							
Jamais	3772	(69.9)	521	(71.5)	3251	(69.6)	0.16
Ancien	885	(16.4)	102	(14.0)	783	(16.8)	
Actuel	742	(13.7)	106	(14.5)	636	(13.6)	
Activité physique, n (%)							
Rarement / jamais	2037	(52.3)	272	(50.6)	1765	(52.6)	0.66
Occasionnellement	667	(17.1)	94	(17.5)	573	(17.1)	
Régulièrement	1189	(30.5)	172	(32.0)	1017	(30.3)	
Consommation d'alcool, n (%)							
Jamais	1604	(29.0)	210	(28.4)	1394	(29.1)	0.90
Occasionnellement	3709	(67.0)	501	(67.7)	3208	(66.9)	
Régulièrement	225	(4.1)	29	(3.9)	196	(4.1)	

MG : Moyenne Géométrique ; IQR : interquartiles

* 89 données manquantes dans la cohorte 3C pour l'IMC, 674 pour le rapport taille/hanche, 7 pour l'hypertension artérielle, 280 pour l'hypercholestérolémie, 393 pour les paramètres lipidiques, 3 pour le statut tabagique, 7 et 74 pour les antécédents de maladie coronarienne et d'AVC respectivement, 103 pour l'âge de la ménopause, 63 pour le type de ménopause, 1751 pour l'activité physique et 1061 pour la consommation d'alcool

^Δ Valeurs de p obtenues par tests du Chi² et Student comparant la sous-cohorte et la cohorte restante

B. Distribution et déterminants des hormones sexuelles endogènes

1. Distribution des hormones sexuelles endogènes

Sur la figure 8 représentant les distributions hormonales, il existe une queue de distribution à droite pour chacune des variables. Pour normaliser ces variables d'intérêt dans nos analyses, une transformation logarithmique a été nécessaire.

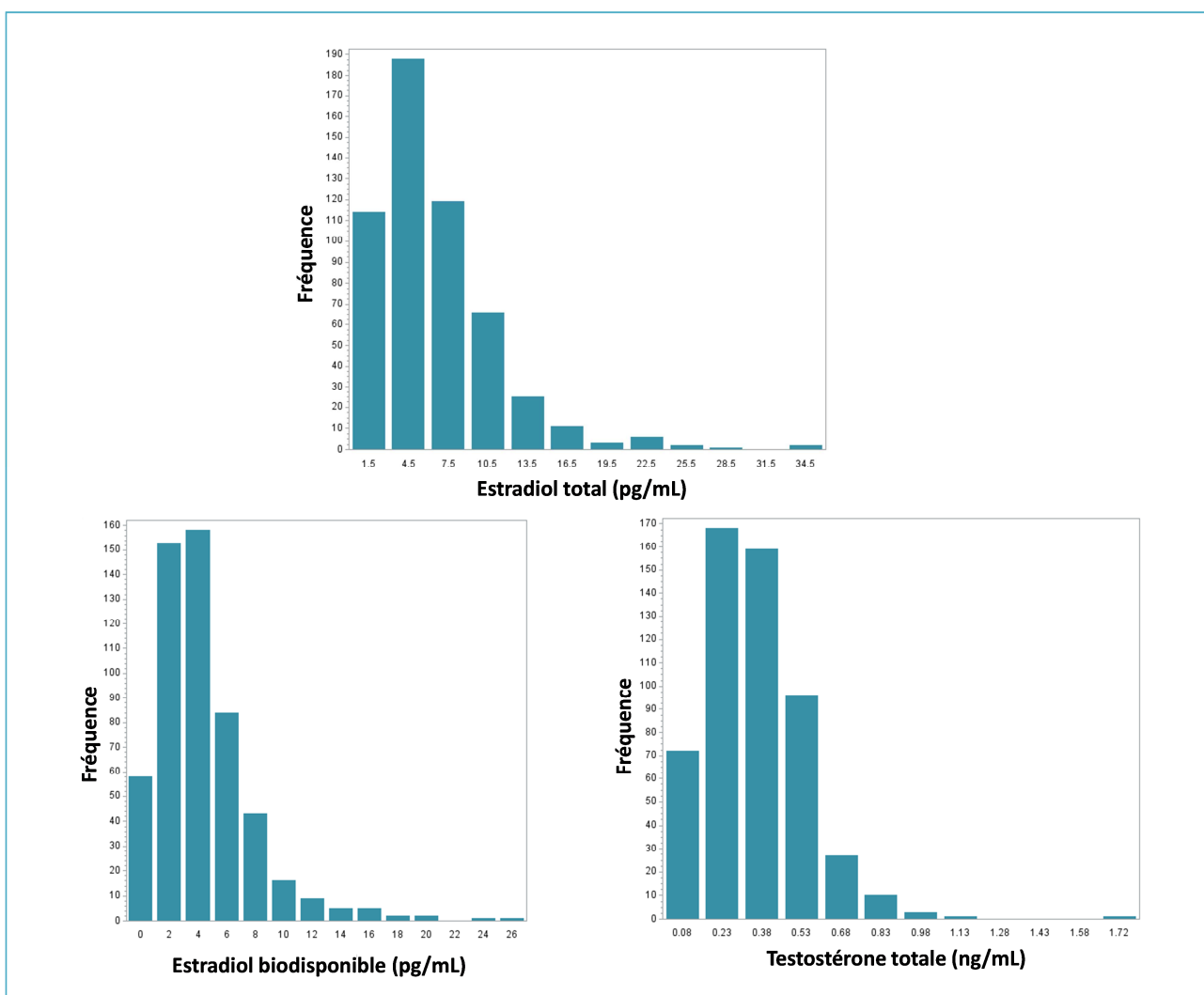


Figure 9. Distribution des hormones sexuelles endogènes dans la sous-cohorte (n=537 femmes)

Les moyennes géométriques des hormones sexuelles des 537 femmes de la sous-cohorte étaient de 4.68 pg/mL pour l'estradiol total, 3.11 pg/mL pour l'estradiol biodisponible et 0.29 ng/mL pour la testostérone. Ces différentes valeurs étaient tout à fait compatibles avec celles de femmes ménopausées. La concentration minimale de l'estradiol total était de 0.6 pg/ml correspondant à la valeur attribuée arbitrairement aux sujets avec des taux inférieurs à la limite de détection. La valeur maximale de l'estradiol était de 36 pg/mL après exclusion des femmes avec des taux supérieurs à 40 pg/mL, seuil au-delà duquel les femmes utilisaient probablement un THM.

Le tableau 2 présente les moyennes des hormones sexuelles en fonction de chaque centre de recrutement. Les niveaux d'estradiol total différaient significativement selon le centre 4.55, 5.37 et 5.59 pg/mL pour Bordeaux, Dijon et Montpellier respectivement ($p=0.03$). Les concentrations d'estradiol étaient plus élevées à Montpellier. Des résultats similaires sont observés pour l'estradiol biodisponible et la testostérone totale.

Tableau 2. Moyenne des hormones sexuelles selon le centre de recrutement parmi les 537 femmes de la sous-cohorte

	Sous-cohorte n=537	CENTRE			p
		Bordeaux n=124	Dijon n=276	Montpellier n=137	
E2 total* (pg/mL)	4.68 (3.51-7.92)	4.55 (2.8-7.110)	5.37 (3.54-9.21)	5.59 (4.00-7.65)	0.03
E2 biodisponible* (pg/mL)	3.11 (2.30-5.64)	2.85 (1.68-4.79)	3.61 (2.39-6.13)	3.91 (2.74-5.44)	< 0.01
Testostérone* (ng/mL)	0.29 (0.21-0.45)	0.24 (0.16-0.41)	0.31 (0.16-0.41)	0.30 (0.20-0.46)	< 0.01

* MG : Moyenne géométrique ; IQR : interquartiles

2. Déterminants des hormones sexuelles endogènes

Le tableau 3 montre les niveaux des hormones sexuelles selon les caractéristiques à l'inclusion des femmes de la sous-cohorte. Les femmes obèses avaient des taux d'estradiol plus élevés que celle avec un IMC normal (5.95 vs 3.95 pg/mL, $p<0.01$). Ce résultat était attendu puisque le tissu adipeux est la principale source des estrogènes chez les femmes ménopausées. Les concentrations d'estradiol étaient augmentées chez les femmes diabétiques et chez celles avec un âge de ménopause plus avancé, sans atteindre néanmoins le seuil de

signification. Par ailleurs, aucune différence significative entre les niveaux d'estradiol n'a été retrouvée en fonction des autres facteurs de risque cardiovasculaire et du type de ménopause. Les taux de testostérone étaient plus faibles chez les femmes dont la ménopause était induite comparés à celles ménopausées naturellement (0.22 vs 0.31 ng/mL, $p<0.01$). Aucune autre différence significative n'a été retrouvée entre les niveaux de testostérone et les caractéristiques à l'inclusion.

Le tableau 4 représente les corrélations entre les différentes hormones sexuelles endogènes et les paramètres biologiques. L'estradiol total était fortement et positivement associée à l'estradiol biodisponible ($r=0.98$, $p<0.001$) et à la testostérone ($r=0.18$, $p<0.001$). Parmi les paramètres biologiques, l'estradiol total était positivement lié aux triglycérides ($r=0.24$, $p<0.001$), au fibrinogène ($r=0.26$, $p<0.001$), au pic de génération de thrombine ($r=0.09$, $p<0.05$) et à la CRP ($r=0.37$, $p<0.001$), et négativement associé au HDL cholestérol ($r=-0.14$, $p<0.01$). Des résultats similaires ont été observés pour l'estradiol biodisponible. Aucune relation significative n'a été mise en évidence entre la testostérone et les paramètres biologiques.

Tableau 3. Moyenne des hormones sexuelles endogènes en fonction des caractéristiques à l'inclusion parmi les femmes de la sous-cohorte (n=537)

	n	Estradiol total (pg/mL)			Testostérone (ng/mL)		
		MG	(IQR)	p	MG	(IQR)	p*
Age							
<72 ans	186	4.65	(3.52-7.90)	0.81	0.28	(0.20-0.46)	0.43
72≤age<78 ans	203	4.64	(3.55-7.60)		0.29	(0.21-0.44)	
≥78 ans	148	4.77	(3.09-8.43)		0.30	(0.22-0.47)	
IMC[£], kg/m²							
Normal (IMC<25)	270	3.95	(2.84-7.13)	<0.01	0.27	(0.20-0.42)	0.10
Surpoids (25≤IMC<30)	186	5.38	(3.97-9.08)		0.32	(0.24-0.49)	
Obésité (IMC≥30)	80	5.95	(4.11-10.47)		0.28	(0.20-0.45)	
Diabète[£]							
Non	507	4.63	(3.48-7.88)	0.31	0.29	(0.20-0.45)	0.39
Oui	29	5.49	(3.55-11.29)		0.32	(0.29-0.52)	
Hypertension artérielle							
Non	126	4.41	(3.40-7.24)	0.40	0.28	(0.21-0.45)	0.68
Oui	411	4.76	(3.54-8.47)		0.29	(0.21-0.46)	
Hypercholestérolémie							
Non	326	4.86	(3.22-8.74)	0.22	0.30	(0.22-0.46)	0.34
Oui	211	4.4	(3.57-7.30)		0.28	(0.20-0.44)	
Statut tabagique							
Jamais	438	4.74	(3.60-7.91)	0.62	0.29	(0.21-0.45)	0.99
Ancien	74	4.57	(2.99-8.43)		0.29	(0.23-0.45)	
Actuel	25	3.98	(3.34-6.34)		0.28	(0.20-0.44)	
Rapport taille/hanche[£]							
<0.80	134	4.17	(3.19-7.68)	0.10	0.27	(0.18-0.40)	0.14
≥0.80	357	4.82	(3.57-8.21)		0.29	(0.21-0.46)	
Age de la ménopause[£]							
<45 ans	84	4.06	(2.73-7.89)	0.25	0.27	(0.20-0.38)	0.45
45≤age<50 ans	108	4.56	(3.28-8.63)		0.29	(0.21-0.43)	
≥50 ans	340	4.86	(3.66-7.91)		0.30	(0.21-0.46)	
Type de ménopause[£]							
Naturelle	430	4.75	(3.54-8.32)	0.37	0.31	(0.22-0.46)	<0.01
Induite	102	4.36	(3.34-7.39)		0.22	(0.16-0.36)	

MG : Moyenne Géométrique, IQR : interquartiles

* p obtenu par test de Student pour les variables dichotomiques ; p de tendance linéaire obtenu par régression linéaire simple pour les variables classées en 3 catégories ordonnées

£ 1 donnée manquante pour l'IMC et le diabète, 46 pour le rapport taille/hanche, 5 pour l'âge et le type de ménopause

Tableau 4. Coefficients de corrélation entre les hormones sexuelles et les paramètres biologiques dans la sous-cohorte (537 femmes)

	E2 total	E2 biodisponible	Testostérone
E2 total	1.00		
E2 biodisponible	0.98 **	1.00	
Testostérone	0.18 **	0.17 **	1.00
Cholestérol total	0.04	0.04	-0.08
LDL cholestérol	0.04	0.05	-0.04
HDL cholestérol	-0.14 **	-0.13 **	-0.06
Triglycérides	0.24 **	0.24 **	0.01
Fibrinogène	0.26 **	0.25 **	0.03
Pic TGT	0.09 *	0.07	0.02
ETP	0.03	0.03	-0.04
Facteur willebrand	0.08	0.06	0.06
D-dimères	0.08	0.07	0.03
CRP	0.37 **	0.36 **	0.07

* p<0.05, ** p<0.001

Le tableau 5 présente les déterminants de l'estradiol total parmi 537 femmes de la sous-cohorte. L'IMC, la testostérone, les triglycérides et l'âge de la ménopause sont associés positivement et indépendamment à l'estradiol. Ils expliquent 12.5% de sa variabilité dont la moitié par l'obésité.

Tableau 5. Déterminants de l'estradiol parmi 537 femmes de la sous-cohorte

	Estradiol Total (pg/mL)		
	β^{\dagger} (sd)	p	R ² (%)
IMC*, kg/m ²	0.21 (0.04)	< 0.01	6.3
Testostérone* (log), ng/mL	0.14 (0.04)	< 0.01	3.5
Triglycérides* (log), g/L	0.12 (0.04)	< 0.01	1.6
Age de la ménopause*, années	0.10 (0.04)	< 0.01	1.1
R ² du modèle (%)			12.5

[†]Coefficients de régression linéaire multiple standardisés

*Coefficients estimés pour l'augmentation d'un écart-type de la valeur explicative
10 données manquantes

C. Estrogènes endogènes et risque artériel ischémique à 4 ans

1. Facteurs de risque cardiovasculaire

Un événement artériel ischémique est survenu durant les 4 ans de suivi parmi 106 femmes, incluant 39 cas d'AVC ischémiques et 25 cas d'infarctus du myocarde dont 10 événements fatals, 12 angors, 25 angioplasties coronariennes, 5 pontages aorto-coronariens.

Les caractéristiques des sujets et les paramètres biologiques à l'inclusion sont décrits dans les tableaux 6 et 7 en fonction du statut de maladie artérielle ischémique.

Les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels associés significativement au risque artériel ischémique étaient l'âge, le diabète et l'hypertension artérielle. En effet, les cas étaient en moyenne plus âgés que les non-cas (76.6 vs 74.3 ans respectivement, $p<0.01$), plus souvent diabétiques (20.8% vs 6.7% respectivement, $p<0.01$) et hypertendus (86.8% vs 76.3% respectivement, $p=0.02$). En revanche, aucune différence significative entre l'obésité, l'hypercholestérolémie, le statut tabagique et le risque artériel ischémique n'a été observée. La ménopause apparaissait à l'âge de 49 ans en moyenne et était naturelle pour 80% des femmes, sans différence significative entre les cas de maladie artérielle ischémique et les non-cas. Enfin, la répartition des graisses était plus androgénique chez les cas avec un rapport taille/hanche augmenté (0.85 vs 0.84 respectivement, $p=0.04$).

Les cas avaient un profil lipidique plus défavorable comparé aux non-cas avec un cholestérol total, un LDL cholestérol et des triglycérides plus élevés (2.41 vs 2.31 g/L respectivement, $p=0.01$ pour le cholestérol total ; 1.52 vs 1.42 g/L respectivement, $p<0.01$ pour le LDL cholestérol et 1.09 vs 1.00 respectivement, $p=0.04$ pour les triglycérides). Les taux de CRP et de fibrinogène étaient augmentés significativement chez les femmes ayant développé une maladie artérielle ischémique comparées aux non-cas (3.24 vs 2.21 mg/L respectivement, $p<0.01$ pour la CRP et 3.69 vs 3.42 g/L respectivement, $p<0.01$ pour le fibrinogène). Cependant, aucune différence significative entre les cas et les non-cas n'a été retrouvée pour les autres paramètres de l'hémostase.

Tableau 6. Comparaison des caractéristiques à l'inclusion entre les cas et les non-cas de maladies artérielles ischémiques chez 628 femmes de l'étude cas-cohorte 3C

	Non-cas		Cas de maladie artérielle ischémique*		p**
	(n=522)		(n=106)		
Age, moyenne (sd), années	74.3	(5.3)	76.6	(5.7)	<0.01
Centre, n (%)					
Bordeaux	120	(23)	31	(29.3)	0.38
Dijon	269	(51.5)	51	(48.1)	
Montpellier	133	(25.5)	24	(22.6)	
Niveau d'éducation, n (%)					0.55
Primaire	206	(39.5)	42	(39.6)	
Secondaire et CAP/BEP	154	(29.5)	36	(34.0)	
Bac et université	162	(31.0)	28	(26.4)	
IMC†, moyenne (sd), kg/m²	25.6	(4.8)	26.5	(4.7)	0.10
Diabète‡, n (%)					
Non	466	(89.4)	80	(75.5)	<0.01
Insulinorésistance	20	(3.8)	4	(3.8)	
Diabète	35	(6.7)	22	(20.8)	
Hypertension artérielle, n (%)	398	(76.3)	92	(86.8)	0.02
Hypercholestérolémie, n (%)	330	(63.2)	70	(66.0)	0.58
Statut Tabagique, n (%)					
Jamais	427	(81.8)	86	(81.1)	0.83
Ancien	70	(13.4)	16	(15.1)	
Actuel	25	(4.8)	4	(3.8)	
Age de la ménopause§, moyenne (sd), années	49.4	(5.6)	48.6	(6.1)	0.17
Type de ménopause^, n (%)					
Naturelle	421	(81.4)	84	(79.3)	0.74
Chirurgicale	41	(7.9)	8	(7.6)	
Autre	55	(10.6)	14	(13.2)	
Activité physique^, n (%)					
Rarement / jamais	197	(53.7)	37	(52.9)	0.16
Occasionnellement	58	(15.8)	17	(24.3)	
Régulièrement	112	(30.5)	16	(22.9)	
Consommation d'alcool^, n (%)					
Jamais	144	(28.2)	34	(33.3)	0.23
Occasionnellement	347	(67.9)	67	(65.7)	
Régulièrement	20	(3.9)	1	(1.0)	
Rapport Taille/Hanche&, MG (IQR)	0.84 (0.79-0.88)		0.85 (0.82-0.89)		0.04

* Incluant 67 cas de cardiopathies ischémiques et 39 cas d'AVC ischémiques

** Valeurs de p obtenues par tests du Chi² et Student

MG : Moyenne géométrique ; IQR : Interquartiles

[†] 2 données manquantes, [§] 6 données manquantes, [&] 56 données manquantes, ^Δ 5 données manquantes, [£] 191 données manquantes, ^λ 15 données manquantes

Tableau 7. Comparaison des paramètres biologiques à l'inclusion entre les cas et les non-cas de maladies artérielles ischémiques chez 628 femmes de l'étude cas-cohorte 3C

Paramètre biologique à l'inclusion	Non-cas (n=522)		Cas de maladie artérielle ischémique (n=106)		p*
Cholestérol total, MG (IQR), g/L	2.31	(2.07-2.59)	2.41	(2.12-2.73)	0.01
LDL cholestérol[^], MG (IQR), g/L	1.42	(1.21-1.68)	1.52	(1.27-1.82)	<0.01
HDL cholestérol, MG (IQR), g/L	0.65	(0.56-0.76)	0.62	(0.56-0.73)	0.12
Triglycérides, MG (IQR), g/L	1.00	(0.76-1.29)	1.09	(0.83-1.45)	0.04
CRP[^], MG (IQR), mg/L	2.21	(1.10-4.20)	3.24	(1.50-5.60)	<0.01
Paramètres de l'hémostase					
Fibrinogène [^] , moyenne (SD), g/L	3.42	(0.68)	3.69	(0.82)	<0.01
Pic TGT [^] , moyenne (SD), nmol/L	334.6	(60.6)	342.5	(58.2)	0.22
ETP [^] , moyenne (SD), nmol/L/min	1764.3	(329.7)	1789.5	(369)	0.48
Facteur von Willebrand, MG (IQR), %	131.7	(110.0-159.0)	140.0	(115.0-164.0)	0.06
D-Dimères, moyenne (SD), ng/mL	760.0	(726.4)	837.8	(512.1)	0.19

MG : Moyenne Géométrique ; IQR : Interquartile

* Valeurs de p obtenues par tests du Student

[^]Données manquantes : 1 pour le LDL cholestérol, 3 pour la CRP, 18 pour le fibrinogène, 10 pour le pic de TGT et l'ETP

2. Estrogènes endogènes et risque artériel ischémique

Dans un premier temps, les moyennes des taux d'hormones sexuelles endogènes à l'inclusion ont été comparées entre les cas de maladies artérielles ischémiques et les non-cas. Le tableau 8 montre que les taux d'estradiol total ou biodisponible étaient significativement plus élevés chez les cas comparés aux non-cas (6.0 vs 5.2 pg/mL respectivement, p=0.01 pour l'estradiol total et 4.0 vs 3.5 pg/mL respectivement, p=0.03 pour l'estradiol biodisponible). En revanche, aucune association significative n'a été décelée entre la testostérone et le risque artériel ischémique.

Tableau 8. Moyenne des hormones sexuelles endogènes en fonction du statut cas/non-cas de maladie artérielle ischémique parmi 628 femmes de l'étude cas-cohorte 3 C

Hormone sexuelle	Non-cas	Cas de maladie artérielle ischémique	p [†]
	(n=522)	(n=106)	
E2 Total, MG (IQR), pg/mL	5.19 (3.5-7.9)	6.05 (4.4-9.2)	0.01
E2 Biodisponible, MG (IQR), pg/mL	3.48 (2.3-5.6)	4.04 (2.7-6.4)	0.03
Testostérone, MG (IQR), ng/mL	0.29 (0.21-0.45)	0.28 (0.20-0.44)	0.57

[†] valeur de p obtenue par test de student

L'association entre les hormones sexuelles endogènes et le risque de maladie artérielle ischémique a été ensuite étudiée à l'aide d'un modèle de Cox. Les HR de maladie artérielle ischémique en fonction des hormones sexuelles sont présentés dans le tableau 9. Dans l'analyse avec l'âge comme échelle de temps, le risque de maladie artérielle ischémique était significativement associé à l'augmentation des taux d'estradiol total et biodisponible. Les HR de maladie artérielle ischémique et leur IC à 95 % étaient de 1.39 (1.13-1.72) et 1.38 (1.12-1.70) pour une augmentation d'un écart type du log d'E2 total et biodisponible respectivement. Les sujets présentant un taux d'estradiol total ou biodisponible élevé (quartile 4) avaient un risque plus important de développer une maladie artérielle comparés au groupe de référence (quartile 1) (HR : 1.99 ; IC à 95% : 1.06-3.73 ; p de tendance linéaire = 0.02 et HR : 2.22 ; IC à 95% : 1.18-4.20 ; p de tendance linéaire = 0.02 respectivement). L'association entre l'estradiol total, l'estradiol biodisponible et le risque artériel ischémique était peu modifiée après ajustement sur le centre de recrutement et les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels. Après ajustement, les HR et leur IC à 95 % étaient de 1.42 (1.12-1.79) et 1.42 (1.12-1.78) pour une augmentation d'un écart type du log d'E2 total et biodisponible respectivement. La prise en compte du rapport taille/hanche montrait des résultats similaires (HR : 1.37 ; IC à 95% : 1.07-1.74 et HR : 1.36 ; IC à 95% : 1.07-1.73, respectivement pour l'estradiol total et biodisponible). Enfin, aucune association n'a été retrouvée entre le risque de maladie artérielle ischémique et les taux de testostérone.

Tableau 9. Hazard ratios de maladie artérielle ischémique en fonction du taux d'hormones sexuelles parmi 628 femmes ménopausées dans l'étude cas-cohorte 3C

Hormone sexuelle	Maladie artérielle ischémique*				
	Nombre de cas	Brut HR (95% IC)	p†	Ajusté‡ HR (95% IC)	p†
E2 total, pg/mL					
Pour 1 SD log	106	1.39 (1.13-1.72)	< 0.01	1.42 (1.12-1.79)	< 0.01
Q1 < 3.51	19	1 [référence]	0.02	1 [référence]	< 0.05
Q2 [3.51-5.27[20	1.33 (0.66-2.66)		1.46 (0.70-3.09)	
Q3 [5.27-7.83[31	1.71 (0.91-3.23)		1.84 (0.90-3.76)	
Q4 ≥ 7.83	36	1.99 (1.06-3.73)		1.99 (0.96-4.10)	
E2biodisponible, pg/mL					
Pour 1 SD log	106	1.38 (1.12-1.70)	< 0.01	1.42 (1.12-1.78)	< 0.01
Q1 < 2.32	18	1 [référence]	0.02	1 [référence]	0.05
Q2 [2.32-3.56[25	1.83 (0.92-3.63)		2.03 (0.96-4.26)	
Q3 [3.56-5.49[26	1.73 (0.89-3.35)		1.90 (0.90-3.98)	
Q4 ≥ 5.49	37	2.22 (1.18-4.20)		2.19 (1.05-4.56)	
Testostérone, ng/mL					
Pour 1 SD log	106	0.93 (0.76-1.14)	0.49	0.91 (0.72-1.15)	0.42
Q1 < 0.23	34	1 [référence]	0.76	1 [référence]	0.33
Q2 [0.23-0.33[21	0.71 (0.39-1.30)		0.67 (0.36-1.26)	
Q3 [0.33-0.45[25	1.03 (0.56-1.87)		0.95 (0.49-1.85)	
Q4 ≥ 0.45	26	0.83 (0.47-1.47)		0.70 (0.37-1.32)	

* Incluant 67 cas incidents de cardiopathies ischémiques et 39 AVC ischémiques

† Valeur de p pour les variables continues et p de tendance linéaire pour les variables en quartiles

‡ Modèle ajusté sur le centre, l'IMC, le diabète, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le statut tabagique

La stabilité de ces résultats a été testée en vérifiant leur homogénéité en fonction des niveaux de facteurs de risque cardiovasculaire dans le tableau 10. Les HR étaient similaires dans les différentes strates et aucun test d'interaction n'était significatif entre les variables d'intérêt et les facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'âge, l'obésité, l'hypercholestérolémie, le diabète et l'hypertension artérielle. De plus, malgré l'effet centre existant pour les hormones sexuelles endogènes, aucune interaction significative n'a été retrouvée entre le centre et l'estradiol (données non présentées).

Tableau 10. Analyse stratifiée du risque artériel ischémique en relation avec les taux d'hormones sexuelles en fonction des niveaux de facteurs de risque cardiovasculaire parmi 628 femmes dans l'étude cas-cohorte 3C

Hormones sexuelles	IMC < 30 kg/m ² (n=88 cas et 445 non-cas)		IMC ≥ 30 kg/m ² (n=18 cas et 77 non-cas)		p interaction*
	HR (95% CI)		HR (95% CI)		
	Pour 1 sd log	p*	Pour 1 sd log	p*	
Estradiol Total, pg/mL	1.36 (1.08-1.7)	0.01	1.40 (0.86-2.28)	0.18	0.11
Estradiol Biodisponible, pg/mL	1.35 (1.08-1.68)	0.01	1.40 (0.83-2.37)	0.21	0.16
Testostérone Totale, ng/mL	0.94 (0.75-1.18)	0.58	0.91 (0.56-1.49)	0.71	0.84
Hormones sexuelles	Diabète NON (n=84 cas et 486 non-cas)		OUI (n=22 cas et 35 non-cas)		p interaction*
	HR (95% CI)		HR (95% CI)		
	Pour 1 sd log	p*	Pour 1 sd log	p*	
Estradiol Total, pg/mL	1.30 (1.05-1.62)	0.02	1.49 (0.89-2.52)	0.13	0.65
Estradiol Biodisponible, pg/mL	1.28 (1.03-1.59)	0.03	1.61 (0.90-2.88)	0.11	0.50
Testostérone Totale, ng/mL	0.88 (0.71-1.10)	0.26	0.95 (0.58-1.54)	0.83	0.73
Hormones sexuelles	Hypertension artérielle NON (n=14 cas et 124 non-cas)		OUI (n=92 cas et 398 non-cas)		p interaction*
	HR (95% CI)		HR (95% CI)		
	Pour 1 sd log	p*	Pour 1 sd log	p*	
Estradiol Total, pg/mL	0.99 (0.54-1.83)	0.98	1.43 (1.14-1.78)	0.00	0.28
Estradiol Biodisponible, pg/mL	1.02 (0.55-1.89)	0.95	1.41 (1.13-1.76)	0.00	0.34
Testostérone Totale, ng/mL	0.72 (0.38-1.35)	0.30	0.97 (0.78-1.20)	0.75	0.29
Hormones sexuelles	Age < 74 ans (n=34 cas et 265 non-cas)		Age ≥ 74 ans (n=72 cas et 257 non-cas)		p interaction*
	HR (95% CI)		HR (95% CI)		
	Pour 1 sd log	p*	Pour 1 sd log	p*	
Estradiol Total, pg/mL	1.64 (1.10-2.44)	0.01	1.30 (1.02-1.66)	0.03	0.09
Estradiol Biodisponible, pg/mL	1.67 (1.11-2.51)	0.01	1.28 (1.01-1.64)	0.04	0.06
Testostérone Totale, ng/mL	0.89 (0.60-1.33)	0.57	0.96 (0.76-1.21)	0.71	0.47
Hormones sexuelles	Hypercholestérolémie NON (n=36 cas et 192 non-cas)		OUI (n=70 cas et 330 non-cas)		p interaction*
	HR (95% CI)		HR (95% CI)		
	Pour 1 sd log	p*	Pour 1 sd log	p*	
Estradiol Total, pg/mL	1.39 (0.99-1.970)	0.06	1.41 (1.08-1.83)	0.01	0.88
Estradiol Biodisponible, pg/mL	1.38 (0.98-1.950)	0.07	1.40 (1.08-1.81)	0.01	0.88
Testostérone Totale, ng/mL	1.06 (0.72-1.57)	0.76	0.88 (0.69-1.12)	0.30	0.41

*p du modèle de cox

Des analyses par type d'événements ont également été réalisées pour les cardiopathies ischémiques et les AVC ischémiques et sont présentées dans les tableaux 11 et 12. Les résultats obtenus pour les cardiopathies ischémiques étaient semblables à ceux retrouvés pour les maladies artérielles ischémiques (HR ajusté et IC à 95% : 1.49 (1.10-2.02), $p=0.01$ pour une augmentation d'un écart type du log d'E2 total). Toutefois, l'association entre l'estradiol total et le risque d'AVC ischémique était à la limite de la significativité (HR ajusté et IC à 95% : 1.34 (0.95-1.89), $p= 0.08$ pour une augmentation d'un écart type du log d'E2 total).

Tableau 11. Hazard ratios de cardiopathie ischémique en fonction du taux d'hormones sexuelles parmi 619 femmes ménopausées dans l'étude cas-cohorte 3C

Hormone sexuelle	Cardiopathie ischémique				
	Nombre de cas	Brut HR (95% IC)	p†	Ajusté‡ HR (95% IC)	p†
E2 total, pg/mL					
Pour 1 SD log	67	1.43 (1.11-1.86)	< 0.01	1.49 (1.10-2.02)	0.01
Q1 < 3.51	12	1 [référence]	0.07	1 [référence]	0.12
Q2 [3.51-5.27[14	1.46 (0.62-3.42)		1.55 (0.61-3.93)	
Q3 [5.27-7.83[19	1.71 (0.77-3.78)		1.72 (0.70-4.25)	
Q4 ≥ 7.83	22	1.98 (0.90-4.35)		2.08 (0.81-5.32)	
E2 biodisponible, pg/mL					
Pour 1 SD log	67	1.45 (1.11-1.88)	< 0.01	1.50 (1.11-2.04)	<0.01
Q1 < 2.32	12	1 [référence]	0.05	1 [référence]	0.10
Q2 [2.32-3.56[15	1.66 (0.70-3.94)		1.76 (0.68-4.54)	
Q3 [3.56-5.49[16	1.58 (0.70-3.58)		1.63 (0.64-4.15)	
Q4 ≥ 5.49	24	2.20 (1.01-4.80)		2.26 (0.89-5.69)	
Testostérone, ng/mL					
Pour 1 SD log	67	0.91 (0.72-1.15)	0.44	0.89 (0.67-1.18)	0.42
Q1 < 0.23	22	1 [référence]	0.60	1 [référence]	0.42
Q2 [0.23-0.33[12	0.61 (0.28-1.31)		0.56 (0.25-1.27)	
Q3 [0.33-0.45[17	0.98 (0.49-1.98)		0.95 (0.42-2.14)	
Q4 ≥ 0.45	16	0.73 (0.36-1.48)		0.61 (0.26-1.40)	

† Valeur de p pour les variables continues et p de tendance linéaire pour les variables en quartiles

‡ Modèle ajusté sur le centre, l'IMC, le diabète, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le statut tabagique

Tableau 12. Hazard ratios d'AVC ischémique en fonction du taux d'hormones sexuelles parmi 627 femmes ménopausées dans l'étude cas-cohorte 3C

Hormone sexuelle	AVC ischémique				
	Nombre de cas	Brut HR (95% IC)	p [†]	Ajusté [‡] HR (95% IC)	p [†]
E2 total, pg/mL					
Pour 1 SD log	39	1.35 (0.95-1.92)	0.08	1.34 (0.95-1.89)	0.08
Q1 < 3.51	7	1 [référence]	0.10	1 [référence]	0.13
Q2 [3.51-5.27[6	1.09 (0.35-3.35)		1.30 (0.40-4.26)	
Q3 [5.27-7.83[12	1.75 (0.67-4.58)		2.17 (0.73-6.46)	
Q4 ≥ 7.83	14	2.00 (0.77-5.15)		1.95 (0.70-5.42)	
E2 biodisponible, pg/mL					
Pour 1 SD log	39	1.30 (0.93-1.82)	0.13	1.32 (0.94-1.84)	0.11
Q1 < 2.32	6	1 [référence]	0.18	1 [référence]	0.20
Q2 [2.32-3.56[10	2.56 (0.91-7.19)		2.93 (0.98-8.76)	
Q3 [3.56-5.49[10	1.84 (0.63-5.34)		2.38 (0.77-7.38)	
Q4 ≥ 5.49	13	2.26 (0.83-6.16)		2.22 (0.76-6.52)	
Testostérone, ng/mL					
Pour 1 SD log	39	0.95 (0.68-1.33)	0.76	0.93 (0.65-1.40)	0.69
Q1 < 0.23	12	1 [référence]	0.77	1 [référence]	0.61
Q2 [0.23-0.33[9	0.98 (0.38-2.55)		0.98 (0.35-2.70)	
Q3 [0.33-0.45[8	0.81 (0.30-2.22)		0.85 (0.31-2.29)	
Q4 ≥ 0.45	10	0.92 (0.38-2.24)		0.81 (0.31-2.08)	

† Valeur de p pour les variables continues et p de tendance linéaire pour les variables en quartiles

‡ Modèle ajusté sur le centre, l'IMC, le diabète, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le statut tabagique

Le tableau 13 montre une analyse de sensibilité du risque artériel ischémique en fonction des hormones sexuelles. Nous avons exclu les anciennes utilisatrices de THM puis celles qui avaient arrêté leur THM moins d'un an avant l'inclusion et enfin celles ayant reçu un THM lors de leur suivi. Aucun de ces résultats n'était discordant avec ceux retrouvés précédemment.

Tableau 13. Analyse de sensibilité du risque de maladie artérielle ischémique en fonction des taux d'hormones sexuelles chez 628 femmes ménopausées dans l'étude cas-cohorte 3C

			Exclusion des femmes utilisant un THM durant le suivi 625 femmes (105 cas)	Exclusion des femmes utilisant un THM 1 an ou moins avant l'inclusion 621 femmes (106 cas)	Exclusion des femmes anciennes utilisatrices de THM 508 femmes (88 cas)
628 femmes (106 cas)					
Paramètres biologiques			HR (95% IC) p	HR (95% IC) p	HR (95% IC) p
Estradiol Total					
Pour 1 SD log	Brut	1.39 (1.13-1.72) < 0.01	1.39 (1.13-1.72) < 0.01	1.39 (1.13-1.71) < 0.01	1.39 (1.12-1.72) < 0.01
	Ajusté*	1.42 (1.12-1.79) < 0.01	1.42 (1.13-1.80) < 0.01	1.42 (1.12-1.79) 0.01	1.43 (1.11-1.85) < 0.01
Estradiol Biodisponible					
Pour 1 SD log	Brut	1.38 (1.12-1.70) < 0.01	1.38 (1.12-1.71) < 0.01	1.38 (1.12-1.70) 0.00	1.38 (1.11-1.72) < 0.01
	Ajusté*	1.42 (1.12-1.78) < 0.01	1.42 (1.13-1.79) < 0.01	1.42 (1.12-1.78) < 0.01	1.42 (1.10-1.84) < 0.01

*Modèle ajusté sur le centre, statut tabagique, obésité, diabète, hypertension artérielle et hypercholestérolémie
(2 valeurs manquantes dans le modèle ajusté)

3. Estrogènes endogènes et risque artériel ischémique en fonction des polymorphismes génétiques associés aux estrogènes

a) Polymorphismes des récepteurs des estrogènes

Le tableau 14 présente les fréquences alléliques et génotypiques associées à chaque polymorphisme des ER dans la sous-cohorte. La distribution des polymorphismes *ESR1* et *ESR2* correspondait à celle attendue dans une population caucasienne et se répartissait pour *rs9340799* notamment comme suit : 45.6%, 42.9% et 11.5% pour AA, AG and GG respectivement. De plus, les fréquences génotypiques respectaient l'équilibre de Hardy Weinberg, puisque tous les tests comparant les fréquences théoriques à celles observées étaient non significatifs. Un déséquilibre de liaison a été retrouvé entre les deux polymorphismes *ESR1* ($D'=1.00$ et $r^2=0.64$) et entre les trois polymorphismes *ERS2* ($0.90 \leq D' \leq 1.00$ et $0.03 \leq r^2 \leq 0.36$), témoignant d'une forte association entre ces différents polymorphismes.

Les moyennes d'estradiol en fonction des polymorphismes *ESR1* et *ESR2* sont représentées dans le tableau 15. Aucune association significative entre les polymorphismes des ER et les taux d'estradiol n'a été retrouvée.

Tableau 14. Fréquence allélique et génotypique des polymorphismes génétiques des récepteurs des estrogènes parmi les femmes de la sous-cohorte (n=533)

Polymorphisme génétique			n	Fréquence génotypique	Fréquence allélique	p HW *
ER α <i>ESR1</i>	rs2234693	CC	93	18.4	F(C)=0.43 F(T)=0.57	0.68
		CT	254	49.7		
		TT	161	31.9		
	rs9340799	AA	233	45.6	F(A)=0.67 F(G)=0.33	0.61
		AG	223	42.9		
		GG	59	11.5		
ER β <i>ESR2</i>	rs1256049	AA	0	0.0	F(A)=0.05 F(G)=0.95	0.23
		AG	51	9.9		
		GG	459	90.1		
	rs4986938	AA	79	15.6	F(A)=0.39 F(G)=0.61	0.67
		AG	238	47.0		
		GG	194	37.4		
	rs1271572	GG	170	33.1	F(G)=0.59 F(T)=0.41	0.11
		GT	262	51.9		
		TT	75	15.0		

Données manquantes : 10 pour rs2234693, 4 pour rs9340799, 8 pour rs1256049, 7 pour rs4986938, 11 pour rs1271572

* p obtenu par un test du χ^2 pour vérifier l'équilibre de Hardy Weinberg

Tableau 15. Taux d'estradiol en fonction des polymorphismes génétiques des ER parmi les femmes de la sous-cohorte 3C (n=533)

Polymorphisme génétique		Estradiol (pg/mL)				Estradiol (pg/mL)				Estradiol (pg/mL)				
		N	MG (IQR)	p*		N	MG (IQR)	p*		N	MG (IQR)	p*		
ER α - <i>ESR1</i>	<i>rs2234693</i> **	CC	96	5.53 (3.62-9.33)	0.42	CC } CT } TT	356	5.18 (3.20-7.91)	0.55	CC } CT } TT	427	5.18 (3.48-7.91)	0.36	
		CT	260	5.06 (3.07-7.66)										
		TT	167	5.37 (3.60-8.42)										
	<i>rs9340799</i> **	AA	241	5.22 (3.57-7.90)	0.17	AA } AG } GG	468	5.15 (3.51-7.85)	0.07	AA } AG } GG	288	5.27 (3.15-8.33)	0.88	
		AG	227	5.08 (2.99-7.68)										
		GG	61	6.04 (3.71-9.75)										
	ER β - <i>ESR2</i>	<i>rs1256049</i> **	AA	0	NA	0.22	AA } AG } GG	52	4.71 (2.56-7.34)	0.22	AA } AG } GG	525	5.22 (3.51-7.91)	NA
			AG	52	4.71 (2.56-7.34)									
			GG	473	5.28 (3.57-8.03)									
		<i>rs4986938</i> **	AA	82	4.88 (2.82-8.47)	0.51	AA } AG } GG	329	5.24 (3.57-7.88)	0.99	AA } AG } GG	444	5.31 (3.60-7.87)	0.28
			AG	247	5.37 (3.68-7.72)									
			GG	197	5.24 (3.04-8.04)									
<i>rs1271572</i> **		GG	173	5.34 (3.57-8.47)	0.92	GG } GT } TT	444	5.26 (3.54-8.04)	0.99	GG } GT } TT	349	5.22 (3.51-7.87)	0.70	
		GT	271	5.21 (3.51-7.74)										
		TT	78	5.26 (3.52-8.00)										

MG : moyenne géométrique, IQR : interquartiles

* p ANOVA ajusté sur le centre et le BMI

** Données manquantes : 10 pour *rs2234693* , 4 pour *rs9340799* , 8 pour *rs1256049* , 7 pour *rs4986938* , 11 pour *rs1271572*

b) Impact des estrogènes endogènes et de leurs récepteurs sur le risque artériel ischémique

Nous avons tout d'abord examiné la relation entre le risque artériel ischémique et les polymorphismes des ER parmi les femmes de l'étude cas-cohorte. Cette analyse qui n'a retrouvé aucune association significative est décrite dans le tableau 16.

Les tableaux 17 et 18 présentent l'analyse de l'association entre l'estradiol et le risque artériel ischémique stratifiée par génotypes. Concernant le polymorphisme *ESR1 rs9340799*, le risque artériel ischémique était lié positivement à l'estradiol chez les femmes porteuses du génotype AA, mais pas chez celles avec le génotype AG/GG (HR:1.62, IC 95%:1.22-2.17 et HR:1.03, IC 95%:0.81-1.30, pour une augmentation d'un écart-type du log d'E2, respectivement; p d'interaction<0.05) (tableau 17). L'interaction entre l'estradiol et le génotype *rs9340799* restait significative après l'application de la correction de Bonferroni. De plus, chez les femmes porteuses du génotype AA, des niveaux élevés d'estradiol étaient associés à une augmentation significative du risque de maladie artérielle ischémique (HR ajusté du 3^{ème} tertile vs 1^{er} tertile : 3.78, IC 95%:1.59-8.99, p de tendance linéaire<0.05). Ce résultat est également illustré par un graphique représentant le risque artériel ischémique en relation avec les quartiles d'estradiol en fonction du génotype *rs9340799* (figure 9). Une association similaire a été observée pour le polymorphisme *rs2234693*, bien que l'interaction entre ce polymorphisme et l'estradiol ne soit pas significative. Concernant les polymorphismes *ESR2*, aucune interaction significative n'a été détectée entre le risque de maladie artérielle ischémique et les taux d'estradiol (tableau 18).

Tableau 16. Hazard ratio de maladie artérielle ischémique en fonction des polymorphismes génétiques des ER parmi 623 femmes ménopausées de l'étude cas-cohorte 3C

		Maladie artérielle ischémique												
Polymorphisme génétique		Non-cas		Cas		HR ^Δ (IC à 95%) p		HR ^Δ (IC à 95%) p		HR ^Δ (IC à 95%) p				
		N	%	N	%									
ER α - <i>ESR1</i>	<i>rs2234693</i> **	CC	93	18.3	22	21.4	1.00		TT	1.00		TT	0.78 (0.49-1.23) 0.28	
		CT	254	50.0	52	50.5	0.81 (0.50-1.32)	0.40	TC	1.19 (0.79-1.80) 0.40	TC	1.00		
		TT	161	31.7	29	28.1	0.72 (0.42-1.23)	0.23	CC		1.00			
	<i>rs9340799</i> *	AA	233	45.2	47	45.6	1.00		AA	1.00		AA	0.75 (0.44-1.28) 0.29	
		AG	223	43.3	41	39.8	0.94 (0.63-1.41)	0.77	AG	1.02 (0.70-1.48) 0.93	AG	1.00		
		GG	59	11.5	15	14.6	1.30 (0.73-2.28)	0.37	GG		1.00			
	ER β - <i>ESR2</i>	<i>rs1256049</i> *	AA	0	NA	0	NA			AA			AA	0.50 (0.21-1.17) 0.11
			AG	51	10.0	5	4.8	NA		AG	NA	AG	1.00	
			GG	459	90.0	100	95.2	NA		GG		1.00		
		<i>rs4986938</i> *	AA	79	15.5	21	20.0	1.00		AA	1.00		AA	1.37 (0.91-2.06) 0.13
			AG	238	83.0	51	48.6	0.89 (0.53-1.48)	0.65	AG	0.79 (0.49-1.27) 0.32	AG	1.00	
			GG	194	38.0	33	31.4	0.67 (0.39-1.15)	0.15	GG		1.00		
<i>rs1271572</i> *		GG	170	33.5	36	34.9	1.00		GG	1.00		GG	1.10 (0.65-1.85) 0.73	
		GT	262	83.1	52	50.5	0.94 (0.62-1.42)	0.77	GT	0.93 (0.63-1.37) 0.70	GT	1.00		
		TT	75	14.8	15	14.6	0.88 (0.50-1.57)	0.67	TT		1.00			

* 12 données manquantes pour *rs2234693*, 5 pour *rs9340799*, 8 pour *rs1256049*, 7 pour *rs4986938*, 13 pour *rs1271572*

^Δ HR ajusté sur age et centre ; NA : Non Applicable

Tableau 17. Hazard ratio de maladie artérielle ischémique en relation avec l'estradiol en fonction des polymorphismes génétiques de *ESR1* parmi 623 femmes ménopausées de l'étude cas-cohorte 3C

Maladie artérielle ischémique**											
Polymorphisme génétique	Nombre d'événements	HR (IC 95%)	p [†]	p corrige ^λ	Nombre d'événements	HR (IC 95%)	p [†]	p corrige ^λ	p d'interaction	p d'interaction corrige ^λ	
<i>rs2234693*</i>	TT (n=190)				TC/CC (n=421)						
Estradiol total, pg/mL											
Pour 1 SD log	29	1.52 (1.06-2.18)	0.02	0.11	74	1.15 (0.94-1.42)	0.18	0.91	0.13	0.65	
T1 < 4.21	4	1 [référence]	0.04	0.22	20	1 [référence]	0.44	1.00			
T2 [4.21-7.27[13	3.39 (1.02-11.29)			28	1.61 (0.90-2.89)					
T3 ≥ 7.27	12	3.09 (0.98-9.82)			26	1.25 (0.65-2.38)					
ER α											
<i>ESR1</i>	<i>rs9340799*</i>	AA (n=280)			AG/GG (n=338)						
Estradiol total, pg/mL											
Pour 1 SD log	47	1.62 (1.22-2.17)	<0.01	<0.05	56	1.03 (0.81-1.30)	0.84	1.00	0.01	<0.05	
T1 < 4.21	7	1 [référence]	<0.01	<0.05	18	1 [référence]	0.54	1.00			
T2 [4.21-7.27[19	3.14 (1.33-7.45)			21	1.22 (0.65-2.27)					
T3 ≥ 7.27	21	3.78 (1.59-8.99)			17	0.76 (0.36-1.61)					

* 12 données manquantes pour *rs2234693*, 5 pour *rs9340799*, 8 pour *rs1256049*, 7 pour *rs4986938* et 13 pour *rs1271572*

** incluant 67 cas incidents de cardiopathies ischémiques et 38 cas incidents d'AVC

[†] p pour les variables continues et p de tendance pour les variables en tertiles

^λ p obtenu après correction de Bonferroni

Modèle ajusté sur le centre, l'IMC, le diabète, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le statut tabagique

Tableau 18. Hazard ratio de maladie artérielle ischémique en relation avec l'estradiol en fonction des polymorphismes génétiques de *ESR2* parmi 623 femmes ménopausées de l'étude cas-cohorte 3C

		Maladie artérielle ischémique**									
Polymorphisme génétique		Nombre			P	Nombre			P	p	P
		d'événements	HR (IC 95%)	p [†]	corrige ^λ	d'événements	HR (IC 95%)	p [†]	corrige ^λ	d'interaction	d'interaction corrige ^λ
ER β <i>ESR2</i>	<i>rs1256049</i>*	GG (n=559)				AG/AA (n=56)					
	Estradiol total, pg/mL										
	Pour 1 SD log	100	1.22 (1.01-1.48)	0.04	0.20	5	3.06 (0.53-17.76)	0.21	1.00	0.30	1.00
	T1 < 4.21	23	1 [référence]	0.10	0.50	3					
	T2 [4.21-7.27[40	1.79 (1.06-3.02)			1	NA				
	T3 ≥ 7.27	37	1.60 (0.91-2.82)			1	NA				
	<i>rs4986938</i>*	AA (n=100)				AG/GG (n=516)					
	Estradiol total, pg/mL										
	Pour 1 SD log	21	1.85 (1.17-2.94)	<0.01	<0.05	84	1.09 (0.88-1.34)	0.42	1.00	0.10	0.50
	T1 < 4.21	1	1	<0.01	<0.05	25	1	0.75	1.00		
	T2 [4.21-7.27[12	22.47 (2.20-229.87)			29	1.03 (0.60-1.76)				
	T3 ≥ 7.27	8	9.65 (0.91-102.43)			30	1.10 (0.62-1.95)				
	<i>rs1271572</i>*	GG (n=206)				GT/TT (n=404)					
	Estradiol total, pg/mL										
	Pour 1 SD log	36	1.36 (0.95-1.94)	0.09	0.47	67	1.20 (0.96-1.51)	0.11	0.54	0.68	1.00
	T1 < 4.21	8	1	0.22	1.00	16	1	0.37	1.00		
	T2 [4.21-7.27[14	1.96 (0.85-4.51)			27	1.57 (0.82-2.99)				
	T3 ≥ 7.27	14	1.74 (0.68-4.44)			24	1.37 (0.69-2.73)				

* 12 données manquantes pour *rs2234693*, 5 pour *rs9340799*, 8 pour *rs1256049*, 7 pour *rs4986938* et 13 pour *rs1271572*

** incluant 67 cas incidents de cardiopathies ischémiques et 38 AVC ; † p pour les variables continues et p de tendance pour les variables en tertiles

^λ p obtenu après correction de Bonferroni ; Modèle ajusté sur le centre, l'IMC, le diabète, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le statut tabagique

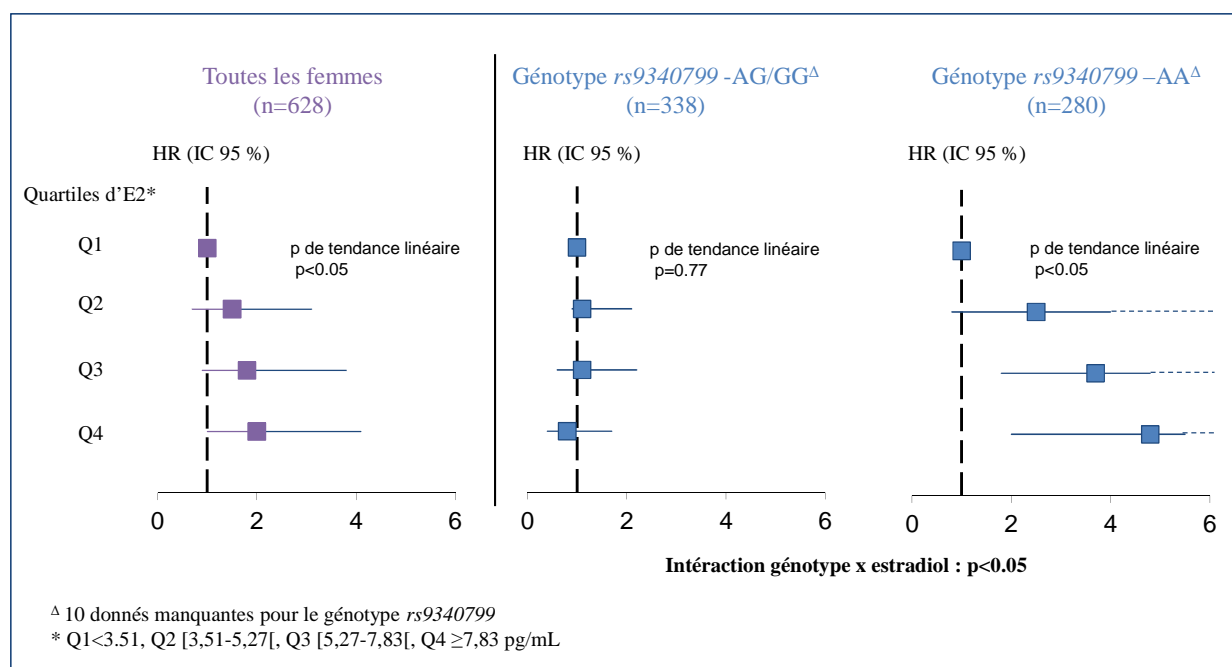


Figure 10. Hazard Ratio (IC 95%) de maladie artérielle ischémique en relation avec les quartiles d'estradiol en fonction du génotype *rs9340799*

c) Stratification par type d'événement

L'analyse stratifiée de l'interaction entre l'estradiol et les polymorphismes des ER par type d'événement est représentée dans les tableaux 19 et 20, pour les cardiopathies ischémiques et AVC ischémiques respectivement. L'estradiol était positivement lié au risque de cardiopathie ischémique chez les femmes porteuses du génotype *rs9340799*-AA, mais pas chez celles avec le génotype *rs9340799*-AG/GG (HR: 1.93, IC95%: 1.28-2.91 et HR: 1.01, IC95%: 0.76-1.35, respectivement; p d'interaction<0.05). En revanche, aucune interaction significative n'a été observée entre l'estradiol et le polymorphisme *rs9340799* pour le risque d'AVC.

Tableau 19. Hazard ratio de cardiopathie ischémique en relation avec l'estradiol en fonction des polymorphismes génétiques des ER parmi les femmes ménopausées de l'étude cas-cohorte 3C

		Cardiopathies ischémiques (n=619)						p d'interaction corrige ^Δ
Polymorphisme génétique		Nombre d'événements	HR (IC 95%)	p [†]	Nombre d'événements	HR (95% CI)	p [†]	
ER α	rs2234693*	TT			CC/CT			
ESR1								
	Estradiol total, pg/mL							
	Pour 1 SD log	18	1.82 (1.13-2.91)	0.06	50	1.10 (0.85-1.43)	1.00	0.31
	T1 < 4.21	2	1 [référence]	0.06	14	1 [référence]	1.00	
	T2 [4.21-7.27[8	3.24 (0.81-13.01)		18	1.64 (0.76-3.54)		
	T3 ≥ 7.27	8	4.18 (1.22-14.32)		18	1.12 (0.48-2.59)		
rs9340799*		AA			AG/GG			
	Estradiol total, pg/mL							
	Pour 1 SD log	28	1.93 (1.28-2.91)	<0.05	40	1.01 (0.76-1.35)	1.00	<0.05
	T1 < 4.21	3	1 [référence]	<0.05	13	1 [référence]	1.00	
	T2 [4.21-7.27[12	4.60 (1.34-15.78)		13	1.09 (0.49-2.43)		
	T3 ≥ 7.27	13	6.58 (1.89-22.93)		14	0.70 (0.28-1.76)		
ER β	rs1256049*	GG			AG/AA			
ESR2								
	Estradiol total, pg/mL							
	Pour 1 SD log	66	1.27 (0.99-1.64)	0.31	4	3.06 (0.53-17.76)	1.00	0.32
	T1 < 4.21	14	1 [référence]	0.57	3	NA		
	T2 [4.21-7.27[25	1.94 (0.98-3.84)		1			
	T3 ≥ 7.27	27	1.79 (0.86-3.74)		0			
rs4986938*		AA			AG/GG			
	Estradiol total, pg/mL							
	Pour 1 SD log	11	2.64 (1.13-6.17)	0.12	59	1.12 (0.87-1.45)	1.00	1.00
	T1 < 4.21	1	1 [référence]	0.17	16	1 [référence]	1.00	
	T2 [4.21-7.27[6	23.30 (2.15-253.11)		20	1.22 (0.61-2.42)		
	T3 ≥ 7.27	4	8.20 (0.42-160.24)		23	1.18 (0.59-2.37)		
rs1271572*		GG			TG/TT			
	Estradiol total, pg/mL							
	Pour 1 SD log	20	1.38 (0.79-2.41)	1.00	49	1.19 (0.92-1.53)	0.95	1.00
	T1 < 4.21	5	1 [référence]	1.00	11	1 [référence]	1.00	
	T2 [4.21-7.27[8	2.02 (0.66-6.13)		18	1.76 (0.79-3.94)		
	T3 ≥ 7.27	7	1.71 (0.43-6.76)		20	1.36 (0.62-2.98)		

* 12 données manquantes pour rs2234693, 5 pour rs9340799, 8 pour rs1256049, 7 pour rs4986938 et 13 pour rs1271572

[†] p pour les variables continues et p de tendance pour les variables en tertiles (Après correction de Bonferroni)

^Δ p obtenu après correction de Bonferroni

Modèle ajusté sur le centre, l'IMC, le diabète, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le statut tabagique

Tableau 20. Hazard ratio d'AVC ischémique en relation avec l'estradiol en fonction des polymorphismes génétiques des ER parmi les femmes ménopausées de l'étude cas-cohorte 3C

		AVC ischémiques (n=627)						P d'interaction corrige ^Δ
Polymorphisme génétique		Nombre d'événements	HR (95% CI)	p [†]	Nombre d'événements	HR (95% CI)	p [†]	
ER α	rs2234693*	TT			CC/CT			
ESR1								
Estradiol total, pg/mL								
Pour 1 SD log		12	1.46 (0.85-2.50)	0.83	29	1.31 (0.94-1.83)	0.56	1.00
T1 < 4.21		2	1 [référence]	1.00	6	1 [référence]	0.65	
T2 [4.21-7.27[5	3.62 (0.27-48.02)		12	1.99 (0.71-5.54)		
T3 ≥ 7.27		5	2.98 (0.26-34.06)		11	2.00 (0.77-5.17)		
rs9340799*		AA			AG/GG			
Estradiol total, pg/mL								
Pour 1 SD log		22	1.33 (0.90-1.96)	0.77	20	1.10 (0.71-1.69)	1.00	1.00
T1 < 4.21		4	1 [référence]	0.88	5	1 [référence]	1.00	
T2 [4.21-7.27[8	2.16 (0.63-7.42)		9	1.71 (0.57-5.20)		
T3 ≥ 7.27		10	2.24 (0.69-7.35)		6	1.18 (0.35-3.99)		
ER β	rs1256049*	GG			AG/AA			
ESR2								
Estradiol total, pg/mL								
Pour 1 SD log		40	1.20 (0.91-1.58)	0.94	2	0.38 (0.11-1.33)	1.00	1.00
T1 < 4.21		9	1 [référence]	1.00	0	1 [référence]	1.00	
T2 [4.21-7.27[16	1.69 (0.74-3.86)		1	NA		
T3 ≥ 7.27		15	1.60 (0.71-3.63)		1	NA		
rs4986938*		AA			AG/GG			
Estradiol total, pg/mL								
Pour 1 SD log		10	2.18 (1.15-4.12)	0.08	32	1.10 (0.78-1.54)	1.00	0.87
T1 < 4.21		0	1 [référence]	0.18	9	1 [référence]	1.00	
T2 [4.21-7.27[6	NA		11	1.00 (0.42-2.34)		
T3 ≥ 7.27		4	NA		12	1.36 (0.57-3.27)		
rs1271572*		GG			TG/TT			
Estradiol total, pg/mL								
Pour 1 SD log		17	1.38 (0.90-2.12)	0.68	24	1.40 (0.92-2.15)	0.60	1.00
T1 < 4.21		3	1 [référence]	0.93	5	1 [référence]	0.70	
T2 [4.21-7.27[7	2.98 (0.72-12.38)		10	1.84 (0.60-5.63)		
T3 ≥ 7.27		7	2.31 (0.62-8.64)		9	2.41 (0.73-7.93)		

* 12 données manquantes pour rs2234693, 5 pour rs9340799, 8 pour rs1256049, 7 pour rs4986938 et 13 pour rs1271572

[†] p pour les variables continues et p de tendance pour les variables en tertiles (Après correction de Bonferroni)

^Δ p obtenu après correction de Bonferroni

Modèle ajusté sur le centre, l'IMC, le diabète, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le statut tabagique

d) Rôle médiateur des paramètres de l'hémostase et de l'inflammation

Pour identifier des médiateurs biologiques impliqués dans l'augmentation du risque artériel ischémique chez les femmes à niveau élevé d'estradiol et porteuses du génotype *rs9340799*-AA, nous avons évalué la part de cette association expliquée par les paramètres de l'hémostase et de l'inflammation (figure 11 et tableau 21). La prise en compte de tous les paramètres de l'hémostase chez les femmes avec le génotype AA réduisait de 29% le risque artériel ischémique (HR : 1.58 (IC 95%:1.21-2.05) et 1.41 (IC 95%:1.06-1.90) pour une augmentation d'un écart-type du log d'E2, avant et après ajustement respectivement), suggérant le rôle médiateur d'une hypercoagulabilité. Le fibrinogène expliquait à lui seul 21% de l'excès de risque. L'ajustement sur la CRP seule expliquait 13% du risque artériel ischémique. Toutefois, la prise en compte de la CRP en plus des paramètres de l'hémostase n'expliquait pas davantage la relation entre l'estradiol et le risque de maladie artérielle ischémique.

Tableau 21. Impact des paramètres de l'hémostase et de l'inflammation sur la relation entre l'estradiol et le risque artériel ischémique chez les femmes porteuses du génotype *rs9340799*-AA (n=266)

Modèle	Covariates	Maladie artérielle ischémique		
		HR pour 1 SD log E2	95% IC	% du risque expliqué*
Brut	Age et centre	1.46	(1.10-1.95)	-
Ajusté sur	Facteurs de risque cardiovasculaire	1.58	(1.21-2.05)	-
	Fibrinogène	1.46	(1.09-1.96)	21
	Pic TGT	1.53	(1.17-2.01)	9
	ETP	1.57	(1.21-2.05)	2
	FvW	1.54	(1.19-2.01)	7
	Ddimères	1.58	(1.21-2.06)	0
	Tous les paramètres de l'hémostase	1.41	(1.07-1.93)	29
	CRP	1.51	(1.12-2.03)	13
	Hémostase + CRP	1.41	(1.05-1.95)	29

$$* \% \text{ du risque expliqué} = \frac{(HR_1 - HR_n) \times 100}{(1 - HR_1)}$$

où HR_1 représente le HR estimé avec le modèle ajusté sur les facteurs de risque cardiovasculaire et HR_n ceux estimés en ajoutant chaque covariate n (hémostase et inflammation) dans le modèle

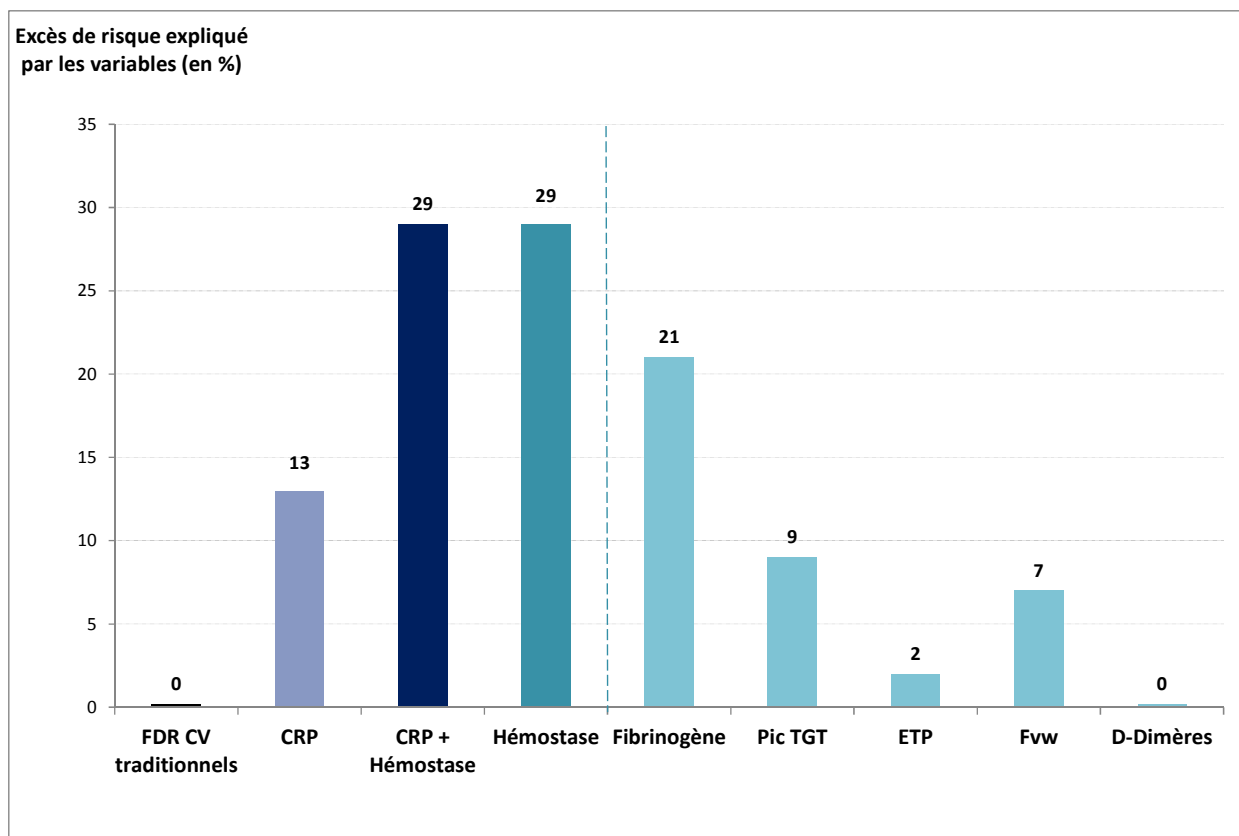


Figure 11. Impact des paramètres de l'hémostase et de l'inflammation sur la relation entre l'estradiol et le risque artériel ischémique chez les femmes porteuses du génotype rs9340799-AA

D. Estrogènes endogènes et risque cardiovasculaire après 10 ans de suivi

L'association entre les estrogènes endogènes et le risque cardiovasculaire (cardiopathie ischémique, AVC et décès cardiovasculaire) après 10 ans de suivi a été étudiée à l'aide d'un modèle de Cox dans la sous-cohorte. Le tableau 22 présente les HR du risque cardiovasculaire en fonction des hormones sexuelles parmi 623 femmes ménopausées n'utilisant pas de THM à l'inclusion. Après 10 ans de suivi, 69 événements cardiovasculaires incluant 30 cardiopathies ischémiques, 14 AVC et 25 décès cardiovasculaires ont été observés.

Le risque cardiovasculaire était significativement associé à l'augmentation des taux d'estrogènes endogènes dans le modèle brut et ajusté sur les facteurs de risque

cardiovasculaire. Les HR ajustés de maladie cardiovasculaire et leur IC à 95% étaient de 1.34 (1.05-1.70) et 1.31 (1.02-1.67) pour une augmentation d'un écart type du log d'E2 total et biodisponible respectivement. Les sujets présentant un taux d'estradiol total élevé (quartile 4) avaient un risque plus important de développer une maladie artérielle comparés au groupe de référence (quartile 1) (HR : 2.29 ; IC à 95% : 1.20-4.39 ; p de tendance linéaire = 0.01). L'association entre l'estradiol total, l'estradiol biodisponible et le risque cardiovasculaire n'était pas modifiée par l'inclusion des antécédents cardiovasculaires dans le modèle. Nous avons ensuite stratifié ces analyses par type d'événement cardiovasculaire. Les résultats obtenus pour les cardiopathies ischémiques étaient semblables à ceux retrouvés pour tous les événements cardiovasculaires (tableau 23). En revanche, aucune association significative n'a été retrouvée entre l'estradiol total et le risque d'AVC ou de décès cardiovasculaire.

Aucune association n'a été retrouvée entre le risque de cardiovasculaire et les taux de testostérone dans le modèle brut (tableau 22). Néanmoins, une relation inverse entre les concentrations de testostérone et le risque cardiovasculaire a été mise en évidence après ajustement sur les facteurs de risque cardiovasculaire et les antécédents cardiovasculaires (HR : 0.79 ; IC à 95% : 0.64-0.98). De plus, la prise en compte de la testostérone renforçait l'association entre l'estradiol total et le risque cardiovasculaire (HR : 1.41 ; IC à 95% : 1.10-1.79). Ces résultats suggèrent que le risque cardiovasculaire est associé à une activité de l'aromatase plus élevée, se traduisant par une baisse de la testostérone et une augmentation de l'estradiol.

Tableau 22. Risque cardiovasculaire (cardiopathie ischémique, AVC ou décès cardiovasculaire) après 10 ans de suivi en fonction des taux d'hormones sexuelles parmi 623 femmes ménopausées de la sous-cohorte 3C n'utilisant pas de THM

	Événement cardiovasculaire à 10 ans								
	Brut*			Modèle 1 [§]		Modèle 2 [§]		Modèle 3 [§]	
	Nombre de cas	HR (95% CI)	p [†]	HR (95% CI)	p [†]	HR (95% CI)	p [†]	HR (95% CI)	p [†]
Estradiol Total (pg/ml)									
Pour 1 SD log	69	1.40 (1.11-1.77)	< 0.01	1.34 (1.05-1.70)	0.02	1.32 (1.04-1.68)	0.02	1.41 (1.10-1.79)	< 0.01
Tertile 1 (E2<3.96)	13	1	< 0.01	1	0.01	1	0.02	1	< 0.01
Tertile 2 (3.96≤E2<7.08)	25	1.92 (1.00-3.71)		1.75 (0.90-3.42)		1.68 (0.85-3.31)		1.81 (0.93-3.54)	
Tertile 3 (E2≥7.08)	31	2.60 (1.37-4.91)		2.29 (1.20-4.39)		2.19 (1.15-4.18)		2.55 (1.34-4.83)	
Estradiol Biodisponible (pg/ml)									
Pour 1 SD log	69	1.36 (1.07-1.73)	0.01	1.31 (1.02-1.670)	0.03	1.30 (1.01-1.66)	0.04	1.37 (1.06-1.76)	0.02
Tertile 1 (E2 bio<2.62)	15	1	0.02	1	0.10	1	0.12	1	0.05
Tertile 2 (2.62≤E2 bio<4.77)	27	1.89 (1.01-3.56)		1.67 (0.87-3.19)		1.58 (0.82-3.04)		1.69 (0.88-3.22)	
Tertile 3 (E2 bio≥4.77)	27	2.04 (1.09-3.83)		1.73 (0.91-3.27)		1.67 (0.88-3.15)		1.90 (1.00-3.60)	
Testostérone Totale (ng/ml)									
Pour 1 SD log	69	0.86 (0.69-1.070)	0.17	0.81 (0.66-1.01)	0.06	0.79 (0.64-0.98)	0.03	NA	
Tertile 1 (T<0.25)	25	1	0.67	1	0.30	1	0.28		
Tertile 2 (0.25≤E2<0.39)	20	0.79 (0.44-1.43)		0.79 (0.43-1.46)		0.82 (0.45-1.49)			
Tertile 3 (E2≥0.39)	24	0.88 (0.51-1.55)		0.72 (0.40-1.32)		0.71 (0.39-1.31)			

* Modèle ajusté sur age et centre

§ Modèle 1 : ajusté sur le centre, statut tabagique, obésité, diabète, hypertension artérielle et hypercholestérolémie (5 valeurs manquantes)

§ Modèle 2 : modèle 1 + antécédents cardiovasculaires

§ Modèle 3 : modèle 2 + testostérone

† Valeurs de p pour les variables continues et p de tendance linéaire pour les variables en tertiles

Tableau 23. Risque de cardiopathie ischémique après 10 ans de suivi en fonction des taux d'hormones sexuelles parmi 623 femmes ménopausées de la sous-cohorte 3C n'utilisant pas de THM

	Cardiopathie ischémique (fatal ou non)								
	Brut*			Modèle 1 [§]		Modèle 2 [§]		Modèle 3 [§]	
	Nombre de cas	HR (95% CI)	p [†]	HR (95% CI)	p [†]	HR (95% CI)	p [†]	HR (95% CI)	p [†]
Estradiol Total (pg/ml)									
Pour 1 SD log	36	1.46 (1.11-1.93)	0.01	1.35 (1.03-1.77)	0.03	1.34 (1.01-1.77)	0.04	1.49 (1.10-2.00)	< 0.01
Tertile 1 (E2<3.96)	5	1	<0.01	1	0.03	1	0.03	1	
Tertile 2 (3.96≤E2<7.08)	15	3.04 (1.12-8.22)		2.7 (0.99-7.38)		2.7 (0.99-7.23)		2.93 (1.07-8.03)	< 0.01
Tertile 3 (E2≥7.08)	16	3.52 (1.29-9.64)		2.9 (1.06-7.81)		2.7 (0.99-7.95)		3.51 (1.29-9.57)	

* Modèle ajusté sur age et centre

§ Modèle 1 : ajusté sur le centre, statut tabagique, obésité, diabète, hypertension artérielle et hypercholestérolémie (5 valeurs manquantes)

§ Modèle 2 : modèle 1 + antécédents cardiovasculaires

§ Modèle 3 : modèle 2 + testostérone

† Valeurs de p pour les variables continues et p de tendance linéaire pour les variables en tertiles

L'impact des paramètres de l'hémostase et de l'inflammation sur la relation entre l'estradiol et le risque cardiovasculaire après 10 ans de suivi a été recherché. Les résultats étaient similaires à ceux retrouvés à 4 ans chez les femmes porteuses du génotype *ESR1 rs9340799-AA*. La prise en compte de tous les paramètres de l'hémostase chez les femmes de la sous-cohorte réduisait de 35% le risque cardiovasculaire (HR : 1.34 (IC 95%:1.04-1.72) et 1.22 (IC 95%:0.95-1.57) avant et après ajustement respectivement). L'inflammation explique un tiers de la relation entre l'estradiol et le risque cardiovasculaire (HR : 1.23 (IC 95%:0.95-1.60) après ajustement). Enfin, la prise en compte de la CRP en plus des paramètres de l'hémostase explique près de 50 % la relation entre l'estradiol et le risque cardiovasculaire (HR : 1.18 (IC 95%:0.91-1.52) après ajustement).

Tableau 24. Impact des paramètres de l'hémostase et de l'inflammation sur la relation entre l'estradiol et le risque cardiovasculaire après 10 ans de suivi parmi 623 femmes ménopausées de la sous-cohorte 3C n'utilisant pas de THM

Modèle	Covariates	Risque cardiovasculaire		
		HR pour 1 SD log E2	95% IC	% du risque expliqué*
Brut	Age et centre	1.40	(1.09-1.8)	-
Ajusté sur	Facteurs de risque cardiovasculaire	1.34	(1.04-1.72)	-
	Fibrinogène	1.26	(0.96-1.64)	24
	Pic TGT	1.33	(1.03-1.70)	3
	ETP	1.34	(1.03-1.75)	0
	FvW	1.29	(1.19-2.01)	15
	D-Dimères	1.34	(1.04-1.72)	0
	Tous les paramètres de l'hémostase	1.22	(0.95-1.57)	35
	CRP	1.23	(0.95-1.60)	32
	Hémostase + CRP	1.18	(0.91-1.52)	47

$$* \% \text{ du risque expliqué} = \frac{(HR_1 - HR_n) \times 100}{(1 - HR_1)}$$

où HR_1 représente le HR estimé avec le modèle ajusté sur les facteurs de risque cardiovasculaire et HR_n ceux estimés en ajoutant chaque covariate n (hémostase et inflammation) dans le modèle

V. DISCUSSION

A. Synthèse des principaux résultats

La relation entre les estrogènes endogènes et le risque cardiovasculaire a été étudiée dans une cohorte de femmes ménopausées âgées de plus de 65 ans.

Dans un premier temps, l'augmentation des estrogènes endogènes est apparue comme un nouveau prédicteur du risque artériel ischémique à 4 ans. Cette association était indépendante des facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels. Dans l'analyse stratifiée par type d'événement, l'estradiol était positivement associé au risque de cardiopathie ischémique. Néanmoins, la relation entre les estrogènes endogènes et le risque d'AVC ischémique était à la limite de la signification.

Dans un second temps, la relation entre les estrogènes endogènes et le risque artériel ischémique à 4 ans a été évaluée en fonction des polymorphismes des ER. Nous avons montré que cette association dépendait du statut génétique d'*ESR1*. Le risque artériel ischémique augmente avec l'élévation de l'estradiol chez les femmes porteuses du génotype *rs9340799-AA* mais pas chez celles avec le génotype *rs9340799-AG/GG*. Cet excès de risque peut s'expliquer en partie par une hypercoagulabilité. Par ailleurs, les polymorphismes des ER n'étaient significativement associés ni aux taux d'estradiol, ni au risque artériel ischémique. De plus, aucune interaction significative entre les autres polymorphismes des ER et l'estradiol n'a été observée dans la prédiction de maladie artérielle ischémique.

Enfin, l'extension du suivi de la cohorte 3C à 10 ans a permis de montrer que l'estradiol était un prédicteur indépendant du risque cardiovasculaire à long terme. De plus, nous avons retrouvé que cette association était plus forte en tenant compte de la testostérone. Ainsi, l'élévation des estrogènes peut être liée à une augmentation de l'activité de l'aromatase avec une conversion plus importante d'androgènes. Par ailleurs, la relation positive entre les estrogènes endogènes et le risque cardiovasculaire a été retrouvée spécifiquement pour les cardiopathies ischémiques mais pas pour les AVC ou les décès cardiovasculaires.

B. Données antérieures

1. Estrogènes endogènes et risque cardiovasculaire

A notre connaissance, l'étude 3C est la première à suggérer un effet délétère des estrogènes endogènes sur le risque artériel ischémique indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels chez les femmes ménopausées après 65 ans.

Peu d'études ont évalué le risque artériel ischémique en fonction des taux d'estrogènes endogènes chez les femmes ménopausées. Les premières études de cohorte sur ce sujet n'ont pas montré d'association entre le risque cardiovasculaire et les taux plasmatiques d'estradiol. La Rancho Bernardo Study a évalué le risque de mortalité cardiovasculaire chez 650 femmes ménopausées âgées de 65 ans en moyenne, ne prenant pas de THM à l'inclusion (90). Cette étude n'a pas mis en évidence d'association entre les taux d'estradiol et la survie. Une autre étude de cohorte réalisée chez des femmes ménopausées âgées de 65 ans en moyenne et portant sur 115 cas incidents de maladies artérielles ischémiques a conduit également à des résultats négatifs (55). Toutefois, les femmes de ces deux études étaient en moyenne moins âgées que dans la cohorte 3C. Cependant, dans une étude de cohorte suédoise incluant 195 femmes âgées de 70 à 80 ans, aucune association significative n'a été retrouvée entre les taux d'estradiol des 29 cas de maladies cardiovasculaires et les non-cas (91). Plus récemment, une étude de cohorte et une étude cas-témoins ont mis en évidence que les estrogènes endogènes étaient liés positivement au risque de cardiopathie ischémique (92) et d'AVC ischémique (56), respectivement. Nos résultats sont cohérents avec ces deux dernières études bien que ces associations ne soient plus significatives après ajustement sur les principaux facteurs de risque, notamment l'obésité et la dyslipidémie.

Nous avons montré dans l'étude 3C que la prise en compte des taux de testostérone renforçait la relation entre les estrogènes et le risque cardiovasculaire, suggérant un lien positif entre l'activité de l'aromatase et le risque cardiovasculaire. Ce résultat a été notamment retrouvé dans une étude transversale suédoise incluant 72 femmes ménopausées n'utilisant pas de THM. L'activité de l'aromatase estimée par le rapport E2/testostérone était augmentée chez les femmes ayant un antécédent de maladie cardiovasculaire (93). De plus, la Rancho Bernardo Study a retrouvé une relation en U entre l'activité de l'aromatase et le

risque de mortalité cardiovasculaire (94). Néanmoins, le rapport androsténédione/estrone et non E2/testostérone était utilisé comme indicateur d'aromatisation. Par ailleurs, les données antérieures concernant le rôle propre de la testostérone dans la prédiction du risque cardiovasculaire sont conflictuelles (55, 94-96). Notre étude ne permet pas de conclure à l'existence d'un lien entre la testostérone et le risque artériel ischémique. Cependant, la testostérone biodisponible n'a pas été mesurée, le nombre d'événements cardiovasculaires était plus faible et les femmes plus âgées comparativement aux données antérieures.

2. Polymorphismes des ER et risque cardiovasculaire

Un grand nombre d'études a recherché un lien entre les polymorphismes des ER et le risque artériel ischémique mais a conduit à des résultats conflictuels. Ces discordances peuvent s'expliquer en partie par une forte hétérogénéité dans la qualité des investigations, avec notamment des différences entre les populations étudiées, les modalités d'échantillonnage ou les méthodes d'analyse (60). L'effet des polymorphismes des ER sur le risque cardiovasculaire semblent être différents chez les hommes et les femmes mais seules quelques études ont été stratifiées sur le sexe. De plus, la ménopause et l'utilisation d'un THM ont été rarement prises en compte dans les analyses. Finalement, peu d'auteurs se sont intéressés aux femmes ménopausées et nous avons confronté nos résultats à ceux des études antérieures stratifiées sur le sexe incluant des femmes ménopausées où l'utilisation du THM était prise en compte.

Une étude de cohorte en population générale ayant inclus 3.488 femmes ménopausées âgées de 55 ans et plus, a mis en évidence une association positive entre le risque d'infarctus du myocarde et l'haplotype constitué des allèles *rs2234693*-T et *rs9340799*-A du gène *ESR1* (97). Cependant, aucune donnée n'était disponible pour les femmes n'utilisant pas de THM, bien que les résultats aient été ajustés sur la prise de ce traitement. Par ailleurs, une autre étude a montré que le risque d'AVC augmentait chez des femmes ménopausées porteuses du génotype *rs2234693*-TT et non utilisatrices de THM (62). Les résultats de ces deux dernières études suggèrent une augmentation du risque cardiovasculaire chez les femmes porteuses des allèles *rs2234693*-T ou *rs9340799*-A tous deux en fort déséquilibre de liaison. Contrairement à ces dernières données, une étude cas-témoins japonaise incluant des femmes ménopausées a

montré que les génotypes *rs2234693*-CC et *rs9340799*-GG étaient plus fréquents chez les cas de maladie coronarienne que chez les témoins (98). Cependant, toutes les femmes incluses étaient issues d'une population particulière avec une hypercholestérolémie familiale. Nos résultats négatifs sont finalement compatibles avec ces données discordantes.

Très peu d'études ont évalué la relation entre les polymorphismes *ESR2* et le risque artériel ischémique. La « *Women's Health Study* » a retrouvé que les allèles *rs1256049*-G et *rs1271572*-T augmentaient le risque de cardiopathie ischémique, mais pas d'AVC, tandis que le polymorphisme *rs4986938* n'était lié significativement à aucun événement artériel ischémique (63). Nos données relatives aux polymorphismes *ERS2* ne concordent pas totalement avec les résultats de la « *Women's Health Study* ». Néanmoins, dans cette étude les femmes étaient plus jeunes et les utilisatrices de THM n'étaient pas exclues bien que l'utilisation d'un THM ait été prise en compte dans les résultats ajustés.

Enfin, la plupart des autres investigations sur la relation entre les cardiopathies ischémiques, les AVC et les polymorphismes *ESR1* et *ESR2*, ont conduit à des résultats négatifs (61, 64, 99-101). Nos résultats sont cohérents avec ces dernières données et une méta-analyse récente confirme l'absence de lien entre le risque artériel ischémique et les polymorphismes *ESR1* (60).

L'interaction entre les polymorphismes des ER et l'estradiol dans la survenue d'évènements de santé a été peu recherchée chez les femmes ménopausées. Néanmoins, l'association bien établie entre le risque cancer du sein et l'estradiol a été testée en fonction des polymorphismes du gène *ESR1* dans une étude cas-témoins hollandaise (102). Les résultats ont mis en évidence que cette relation était plus forte chez les femmes avec le génotype *rs2234693*-CT/TT que chez celles avec le génotype *rs2234693*-CC. Cette interaction peut être rapprochée de nos données sur le risque cardiovasculaire puisque les allèles *rs2234693*-T et *rs9340799*-A sont en fort déséquilibre de liaison.

C. Interprétation des données

Le rôle des estrogènes dans le développement des maladies cardiovasculaires reste aujourd'hui débattu. La relative immunité des femmes vis-à-vis des cardiopathies ischémiques a été longtemps attribuée à un rôle protecteur des estrogènes dans le développement de l'athérosclérose et de ses complications. Cette hypothèse n'a cependant pas été confirmée par les résultats des vastes essais randomisés sur le THM. L'administration d'estrogènes ne permet pas de prévenir les maladies artérielles ischémiques chez les femmes ménopausées et pourrait même avoir un effet délétère sur le risque coronaire chez les femmes plus âgées. Nous avons montré dans ce travail que des taux circulants élevés d'estradiol pouvaient prédire la survenue d'un événement cardiovasculaire chez les femmes ménopausées âgées de plus de 65 ans. Certains mécanismes biologiques pourraient expliquer ces résultats. Néanmoins, l'existence d'une association positive entre les estrogènes endogènes et le risque artériel ischémique n'implique pas nécessairement un lien de causalité.

1. Interprétation non causale des résultats

L'interprétation de nos résultats doit rester prudente compte tenu notamment de la nature particulière des études de cohorte réalisées chez les personnes âgées. En effet, ce type d'étude expose à un biais de sélection puisqu'il ne prend pas en compte les sujets décédés avant l'âge de 65 ans requis pour l'inclusion. Dans l'étude 3C, cette troncature à gauche de la survie peut conduire à sous-estimer voire inverser l'association entre la maladie étudiée et la variable d'intérêt. La validité des résultats peut ainsi en être affectée. L'impact de ce biais de sélection peut néanmoins être limité en raison de la faible proportion d'événements fatals contribuant au risque cardiovasculaire global (environ 10% des événements cardiovasculaires sont fatals). De plus, les principaux facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels sont en général retrouvés dans notre étude.

L'interprétation des études de cohorte réalisées chez les personnes âgées est également limitée par les risques compétitifs. En effet, les co-morbidités sont fréquentes chez les sujets après 65 ans, avec une augmentation importante de la mortalité totale et de l'incidence d'autres maladies. Par exemple, les démences sont fréquentes au cours du vieillissement et leur risque peut augmenter avec les taux d'estradiol élevés (51, 52). Dans notre étude, il n'est pas exclu que l'élévation des estrogènes chez les cas incidents de maladies artérielles ischémiques s'explique en partie par une démence sous-jacente. Cette hypothèse est d'autant plus pertinente que les démences vasculaires sont souvent associées à la survenue antérieure d'un AVC. Néanmoins, l'exclusion des cas prévalents et incidents de démence modifie peu nos résultats. De plus, l'estradiol est plus faiblement associé au risque d'AVC qu'à celui de cardiopathie ischémique. Plus généralement, la censure des observations au moment d'un décès non cardiovasculaire n'a pas beaucoup d'influence sur les modèles de Cox. L'impact des risques compétitifs semble ainsi limité dans notre étude.

L'élévation des taux d'estrogènes pourrait être également le reflet un état de santé général altéré sans réelle signification pathogénique vis-à-vis des maladies cardiovasculaires. Une augmentation non spécifique de l'estradiol a été observée lors de la phase aiguë d'une maladie (103). Une élévation de l'activité de l'aromatase dans le tissu adipeux a été également rapportée chez des femmes ménopausées ayant subi un pontage aortocoronarien (104). De plus, une augmentation de l'estradiol peut être un prédicteur de la mortalité toutes causes à court terme chez des sujets hospitalisés en soins intensifs pour défaillance organique multiple (105), mais également à long terme dans la population générale (54).

Une autre source de difficultés rencontrées dans les études sur le vieillissement est liée à l'inclusion fréquente de sujets polymédicamentés. Il est difficile de prendre en compte ce phénomène dans les analyses. Par exemple, la plupart des femmes utilisent un traitement antihypertenseur ou hypolipidémiant. Bien qu'aucun effet de ces traitements sur les concentrations d'estrogènes n'ait été rapporté, une interaction médicamenteuse ne peut être exclue.

La relation entre les estrogènes endogènes et le risque cardiovasculaire est peu altérée par l'ajustement sur les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels. Ce résultat est d'autant plus intéressant que l'obésité est fortement associée aux taux d'estrogènes élevés chez les femmes ménopausées (106, 107). L'impact de ce facteur de confusion potentiel apparaît donc limité dans notre étude. De plus, l'association entre l'estradiol et le risque artériel ischémique n'est pas modifiée en tenant compte du rapport taille/hanche également lié positivement aux estrogènes (106). La relation positive entre l'estradiol et l'IMC s'explique

par l'origine des estrogènes endogènes produits essentiellement par aromatisation des androgènes dans le tissu adipeux après la ménopause. L'IMC et le rapport taille sur hanche sont des marqueurs indirects de la masse grasse et il n'est donc pas exclu que l'adiposité soit un facteur de confusion résiduel. Par ailleurs, les estrogènes endogènes sont associés positivement à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire, notamment l'insulinorésistance, le diabète (106) (107) et le tabagisme (108). Cependant, la relation entre les estrogènes et le risque cardiovasculaire est peu modifiée après ajustement sur ces variables. De même, l'hypertension artérielle et les anomalies du profil lipidique interviennent peu dans nos résultats. Les données concernant leur rôle confondant potentiel restent conflictuelles chez les femmes ménopausées (90, 109-111).

L'élévation de l'estradiol pourrait être une conséquence de la maladie artérielle ischémique et non pas l'inverse. Cette causalité inversée ("reverse causation" des anglosaxons) est fréquemment observée dans le contexte des maladies chroniques et peut remettre en cause la temporalité entre l'effet étiologique supposé d'un facteur et la maladie. L'athérosclérose est le résultat d'un long processus dégénératif évoluant tout au long de la vie le plus souvent de façon asymptomatique. Une maladie artérielle ischémique pourrait être présente chez les sujets avec des taux élevés d'estradiol dès l'inclusion mais se manifester cliniquement au cours du suivi seulement. Certains auteurs ont suggéré que l'augmentation de l'estradiol était un phénomène réactionnel visant à limiter l'extension d'un processus athéromateux (38). Cette hypothèse s'inspire du concept d'intracrinologie consistant en une synthèse locale d'estradiol par l'aromatase dans les tissus spécifiques (112, 113). L'estradiol agirait directement dans la cellule elle-même comme un facteur paracrine ou intracrine. Ainsi, le taux d'estrogènes circulants ne serait que le reflet du métabolisme local des estrogènes. Ce phénomène a été retrouvé chez les femmes atteintes d'un cancer du sein avec une concentration d'estradiol dans la tumeur au moins 20 fois supérieure à celle retrouvée dans le plasma (114). De façon similaire, une étude post-mortem a révélé une surexpression de l'aromatase dans les plaques d'athérome de l'aorte, suggérant une production d'estrogènes in situ accrue en réaction au processus athéromateux (115). Dans l'étude 3C, l'exclusion des cas prévalents et des cas incidents de maladie cardiovasculaire survenant la première année de suivi modifie peu les résultats. D'autres analyses de sensibilité réalisées en fonction du niveau des facteurs de risque cardiovasculaire (exclusion des femmes diabétiques par exemple) n'ont pas montré de modifications importantes des résultats. Enfin, l'effet cardiovasculaire à long

terme des estrogènes suggéré par l'analyse après 10 ans de suivi ne plaide pas non plus en faveur d'une causalité inversée.

L'association entre le risque artériel ischémique et des taux élevés d'estradiol observée spécifiquement chez les femmes porteuses du génotype *rs9340799*-AA doit aussi être interprétée avec prudence. Cette interaction gène-estrogènes pourrait être une simple coïncidence ou relever du hasard. Néanmoins, nous avons tenté de limiter le risque de première espèce dans nos analyses génétiques en tenant compte des tests multiples par la méthode de Bonferroni. Par ailleurs, les polymorphismes génétiques étudiés pourraient être en déséquilibre de liaison avec d'autres variants génétiques d'*ESR1* ou d'autres gènes, eux-mêmes impliqués de façon causale dans le développement des maladies artérielles ischémiques. L'hypothèse de fonctionnalité des polymorphismes du gène *ESR1* est fondée sur leur implication dans de nombreuses maladies, notamment les cancers du sein (79, 102, 116, 117) et de l'endomètre (118), la démence (119, 120) et l'ostéoporose (121, 122). Cependant, les mécanismes d'action relatifs à un possible effet direct de ces polymorphismes sur les tissus cibles, notamment les vaisseaux, demeurent inconnus (41, 57).

2. Mécanismes biologiques potentiels

Des niveaux élevés d'estrogènes plasmatiques pourraient jouer un rôle étiologique dans le développement des maladies artérielles ischémiques par une action directe sur l'athérothrombose. Nos résultats suggèrent un effet délétère des estrogènes dans deux domaine-clés du risque cardiovasculaire : l'inflammation et l'hémostase.

L'analyse transversale de l'étude 3C confirme l'association positive entre l'estradiol et la CRP (46, 47) (123). Ce marqueur d'inflammation systémique est un prédicteur bien établi du risque cardiovasculaire (31) qui explique en partie dans notre étude la relation positive entre l'estradiol et la survenue d'un événement artériel ischémique. Bien que l'effet médiateur potentiel de la CRP soit limité, ce résultat suggère un mécanisme d'action des estrogènes lié à l'inflammation. Un effet proinflammatoire des estrogènes sur les vaisseaux par augmentation du TNF- α (« Tumor Necrosis Factor α ») a été rapporté et pourrait ainsi être impliqué dans la

déstabilisation des plaques athéromateuses (45). De plus, le tissu adipeux sécrète des adipokines impliquées dans la production de cytokines inflammatoires, notamment l'interleukine-6 (IL-6) et le TNF- α , eux-même corrélés positivement à l'estradiol, particulièrement chez les sujets obèses (45, 47, 124). Parallèlement, plusieurs études expérimentales ont montré que le TNF- α pouvait stimuler l'aromatase (125, 126). L'adiposité étant la principale source d'estrogènes chez les femmes ménopausées, l'estradiol pourrait ainsi contribuer à un phénomène d'autoamplification de l'inflammation notamment via le TNF- α . Par ailleurs, l'IL-6 stimule la production de CRP par les cellules hépatocytaires, suggérant un effet plutôt indirect de l'estradiol sur la CRP (127). L'IL-6 pourrait donc jouer un rôle médiateur central dans la relation entre l'estradiol et la CRP. De plus, une étude antérieure a montré que les taux d'IL-6 étaient augmentés chez les porteurs de l'allèle *rs2234693-T* comparés aux homozygotes *rs2234693-CC* (128). Compte tenu du fort déséquilibre de liaison entre les allèles *rs2234693-T* et *rs9340799-A*, un processus inflammatoire pourrait être impliqué dans l'excès de risque cardiovasculaire associé aux taux élevés d'estrogène chez les femmes porteuses de l'allèle *rs9340799-A*. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre ces interrelations complexes.

Le processus thrombotique est également une composante étiologique essentielle des maladies artérielles ischémiques et les paramètres de l'hémostase pourraient jouer un rôle médiateur dans la relation entre l'estradiol et le risque artériel ischémique. Quelle que soit leur nature exogène ou endogène, les estrogènes sont à l'origine d'une hypercoagulabilité chez les femmes pendant la vie reproductive (contraception orale, grossesse). Cet effet est retrouvé chez les utilisatrices d'un THM par voie orale mais le lien entre les estrogènes endogènes et l'hémostase reste peu documenté chez les femmes ménopausées. Une corrélation positive entre l'estradiol circulant et le fibrinogène plasmatique a été rapportée dans les cohortes 3C et ARIC (53, 129). Le fibrinogène est une protéine de la réaction inflammatoire dont l'association avec le risque artériel ischémique est bien établie (29, 30, 72). Il joue un rôle important dans la formation d'un thrombus. C'est également un co-facteur essentiel de l'agrégation plaquettaire et l'un des principaux déterminants de la viscosité plasmatique. De plus, le fibrinogène et la fibrine sont des constituants de la plaque d'athérome (130). Les estrogènes pourraient ainsi avoir un effet délétère sur les vaisseaux à travers ces différents mécanismes. Cette hypothèse est supportée par nos analyses multivariées montrant que les taux élevés de fibrinogène expliquent une part importante de la relation entre l'estradiol et le risque cardiovasculaire. De plus, cet effet médiateur est peu influencé par les niveaux de CRP

suggérant un effet procoagulant du fibrinogène plutôt qu'un reflet de l'inflammation. Dans l'étude 3C, l'estradiol est également lié positivement à la génération de thrombine in vitro. Bien documenté dans la maladie veineuse thromboembolique, ce test global d'hypercoagulabilité a été relié récemment au risque artériel (77) et il pourrait en partie expliquer nos résultats. Finalement, ces effets prothrombotiques des estrogènes souvent attribués à leur rôle modulateur dans la synthèse hépatique des facteurs de la coagulation pourraient être génotypes dépendant via *ESR1*. Une étude cas-témoins nichée dans l'essai américain WHI a mis en évidence une augmentation de la réponse plasmine-antiplasmine chez les femmes utilisatrices d'un THM porteuses du génotype *rs9340799-AA* comparés à celles avec *rs9340799-AG/GG* (101). Bien que les effets métaboliques et vasculaires des estrogènes exogènes et endogènes soient à priori différents, ce résultat suggère que l'augmentation des estrogènes endogènes pourrait induire un état thrombogène par activation de la coagulation et de la fibrinolyse et contribuer ainsi au développement d'une maladie artérielle ischémique. Il n'est pas exclu que d'autres paramètres de l'hémostase non mesurés dans notre étude soient également impliqués dans cette relation. De plus, des interactions complexes entre les facteurs de coagulation et les médiateurs de l'inflammation, notamment l'IL-6 connue pour augmenter le fibrinogène et la viscosité sanguine (131), pourraient être impliqués dans les effets potentiellement délétères des estrogènes.

D'autres mécanismes localisés au niveau de l'artère pourraient expliquer la relation entre les estrogènes et le risque artériel ischémique chez les femmes avec le génotype *rs9340799-AA*. L'action des estrogènes par l'intermédiaire des ER est un phénomène complexe faisant intervenir de multiples facteurs qui activent ou inhibent l'expression de gènes cibles dans des tissus spécifiques. Leurs effets sur les vaisseaux semblent plutôt protecteurs en limitant l'apparition d'athérosclérose par des phénomènes de vasodilatation, myorelaxation et réendothélisation des lésions vasculaires (44). Les estrogènes seraient également capables de réguler l'expression des ER (132) et la chute d'estradiol à la ménopause serait corrélée à une diminution des ER (133). De plus, l'âge augmenterait la méthylation de la région promotrice d'*ESR1*, résultant en une diminution de la transcription d'*ESR* (134). Cette réduction de la quantité des ER dans les cellules vasculaires pourrait être encore plus prononcée chez les femmes portant le génotype *rs9340799-AA*. En effet, une étude a suggéré que l'allèle *rs2234693-T* engendrait une diminution de la transcription d'*ESR1* en réprimant le site de liaison du facteur de transcription B-myb (57). Ce phénomène

pourrait s'observer de façon similaire chez les femmes portant l'allèle *rs9340799*-A compte tenu du déséquilibre de liaison avec l'allèle *rs2234693*-T. Par conséquent, ces données suggèrent que les femmes porteuses du génotype *rs9340799*-AA exprimeraient moins de récepteurs ER α sur les cellules vasculaires comparées aux femmes avec le génotype AG/GG et que ce phénomène serait accéléré par l'âge et la carence estrogénique après la ménopause. L'action bénéfique des estrogènes sur les vaisseaux serait ainsi diminuée chez ces femmes qui développeraient plus facilement des lésions athéromateuses. Cette hypothèse est compatible avec les données montrant une diminution de l'expression des récepteurs ER α dans les cellules endothéliales des plaques athéromateuses par augmentation de la méthylation d'*ESR1* (134). En supposant que les femmes avec le génotype *rs9340799*-AA soient plus susceptibles de développer des plaques d'athérome, comment expliquer que leur risque artériel ischémique soit augmenté avec des hauts niveaux d'estradiol ? Puisque l'hypercoagulabilité et l'inflammation sont associées positivement à l'estradiol, ces mécanismes pourraient être un facteur déclenchant dans la survenue d'un événement clinique aigu en favorisant la rupture d'une plaque et l'apparition d'une thrombose artérielle.

Toutes ces hypothèses restent cependant spéculatives puisque la signalisation des estrogènes est un phénomène très complexe impliquant de multiples cascades moléculaires régulées par un grand nombre de cofacteurs.

D. Forces et limites

1. Forces de l'étude

Cette étude réalisée dans la population générale est prospective et multicentrique. Le schéma d'étude cas-cohorte a permis d'utiliser le même groupe témoin pour analyser différents types d'événements (cardiopathies ischémiques, AVC et démences). Par ailleurs, une analyse non biaisée des associations entre les facteurs de risque cardiovasculaire, les paramètres biologiques et les hormones sexuelles a pu être réalisée à partir d'un échantillon représentatif de la cohorte totale.

Le recueil des caractéristiques des sujets à l'inclusion a été réalisé de façon standardisée lors d'un interrogatoire en face à face. Un grand nombre d'informations collectées à l'inclusion a permis de tenir compte de nombreux facteurs de confusion dans nos analyses, notamment l'utilisation de traitements hormonaux.

Le dosage de l'estradiol et l'identification des polymorphismes des ER à l'inclusion ont été effectués à l'aveugle du statut cas/non-cas. Les concentrations d'estradiol correspondaient à des valeurs compatibles avec la ménopause (80).

Le taux de participation était élevé durant les quatre années de suivi avec un nombre très faible de perdus de vue (inférieur à 3 %). Les événements d'intérêt ont été bien validés par un comité médical d'expert selon des définitions internationales. La recherche des facteurs de risque cardiovasculaire a été réalisée de manière rigoureuse avec peu de données manquantes. Notre étude a une bonne validité interne puisque nous avons retrouvé la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels ainsi que des associations connues entre l'estradiol et des paramètres biologiques.

Enfin, l'étude des associations génétiques ne pouvait pas être influencée par une stratification ou une hétérogénéité de la population puisque la plupart des participants étaient caucasiens. Par ailleurs, les fréquences génotypiques des polymorphismes des ER correspondaient à celles attendues dans une population caucasienne (122).

2. Limites de l'étude

a) Validité externe

Cette étude porte sur une population sélectionnée de femmes. En effet, l'inclusion était réalisée sur la base du volontariat, parmi des individus majoritairement caucasiens, non institutionnalisés, âgés de plus de 65 ans. Par ailleurs, les sujets étaient en moyenne en meilleure santé et d'une catégorie socioprofessionnelle plus élevée que la population générale. Cette procédure de sélection pourrait expliquer le plus faible nombre d'événements cardiovasculaires observé dans notre étude comparé à la population générale. En effet, l'incidence à 10 ans des cardiopathies ischémiques et des AVC chez les femmes a été estimée respectivement à 9.2 ‰ et 4.9 ‰ par an dans notre étude. Dans l'étude américaine Cardiovascular Health Study incluant 5.000 personnes âgées de plus de 65 ans, l'incidence annuelle des cardiopathies ischémiques et des AVC était de 22‰ et 13‰ chez les femmes. Une autre étude américaine, la Framingham Heart Study a retrouvé une incidence annuelle chez les femmes âgées de 65 à 74 ans de 11‰ et 7‰ pour les cardiopathies ischémiques et les AVC respectivement. Nos taux d'incidence sont bien plus faibles que ceux montrés dans les études de cohorte américaine. Néanmoins, la cohorte 3C ayant été réalisée une décennie plus tard comparée aux études précédentes, ces différences peuvent s'expliquer en partie par la diminution de l'incidence des maladies cardiovasculaires observée depuis plusieurs années.

Notre étude concernait les estrogènes endogènes. Nous avons ainsi exclu les femmes en cours d'utilisation d'un THM à l'inclusion ou présentant des taux anormalement élevés d'hormones sexuelles. Nos résultats ne peuvent donc être extrapolés ni aux femmes jeunes récemment ménopausées, ni aux utilisatrices d'un THM, ni aux sujets appartenant à d'autres ethnies.

b) Puissance

Le nombre d'événements incidents de maladie artérielle ischémique survenus à 4 ans est relativement faible. Certains résultats négatifs peuvent ainsi être expliqués par un manque de puissance statistique notamment dans les analyses stratifiées par génotype ou par type d'événement. Dans ce travail, nous avons étudié les maladies artérielles ischémiques dans leur ensemble pour permettre une puissance raisonnable. L'interprétation de nos données doit donc être prudente car les mécanismes de développement des cardiopathies ischémiques ne sont pas superposables à ceux des AVC. Toutefois, nous pouvons conclure à des résultats significatifs en ne considérant que les cardiopathies ischémiques. Les analyses concernant les AVC ischémiques seuls portent sur un nombre de cas incidents insuffisant.

L'extension du suivi à 10 ans nous a permis d'évaluer l'influence des estrogènes endogènes sur le risque cardiovasculaire à long terme. Néanmoins, nous ne disposons pas de la concentration en estradiol pour tous les cas incidents additionnels survenus entre 4 et 10 ans. Par conséquent, nos analyses ont été restreintes à la sous-cohorte. De plus, pour évaluer le risque cardiovasculaire après 10 ans de suivi avec une puissance suffisante, nous avons combiné les décès d'origine cardiovasculaire et les événements artériels ischémiques fatals ou non.

c) Méthode de mesure de l'estradiol

Dans notre étude, la quantité de plasma disponible à l'inclusion était limitée et l'estradiol a été mesuré par RIA direct. Cette méthode est généralement moins sensible que la méthode RIA conventionnelle ou la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, particulièrement pour les faibles taux d'estradiol après la ménopause (75). Néanmoins, les kits de dosage utilisés dans notre étude présentaient une limite de détection de 2 pg/ml, inférieure à celle notifiée dans d'autres méthodes RIA (135). L'estradiol était inférieur à cette limite de détection pour seulement 8% des sujets et cette troncature des données ne pouvaient pas altérer les analyses par quartiles. Par ailleurs, bien que les méthodes RIA conventionnelles ou la spectrométrie de masse soient recommandées pour mesurer de faibles taux d'estradiol, des

difficultés de dosage ont été également rapportées pour des niveaux inférieurs à 5 pg/ml (135).

En l'absence d'étapes préliminaires de purification, la méthode RIA directe manque également de spécificité en raison de la présence d'autres métabolites interférant avec l'estradiol par des réactions croisées. Cette procédure peut conduire ainsi à une surestimation des valeurs de l'estradiol. Néanmoins, ce phénomène semble plus prononcé chez les femmes utilisant un THM par voie orale en raison notamment des taux élevés d'estrone circulant (75).

Comparée au « gold standard » que représente la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse, la méthode RIA n'est probablement pas la plus fiable pour mesurer l'estradiol à des concentrations faibles en pratique clinique courante. Néanmoins, ses caractéristiques métrologiques peuvent être acceptables dans les études épidémiologiques où l'objectif est d'estimer un risque relatif sans référence particulière à une valeur diagnostique. Malgré d'importantes variations inter-laboratoires, les méthodes RIA directes apparaissent suffisamment reproductibles pour être utilisées à l'échelle d'une population (136-138). Dans notre étude, tous les dosages étaient réalisés en série dans le même laboratoire avec un contrôle de qualité strict assurant une bonne comparabilité des mesures au cours du temps. Par ailleurs, la validité des mesures d'estradiol par RIA direct comparé à la spectrométrie de masse a été montrée dans les études concernant les estrogènes endogènes et le risque de cancer du sein chez les femmes ménopausées (139). Dans ces études, le classement des valeurs relatives d'estradiol est généralement conservé et ne modifie pas ou peu la transformation des variables biologiques en données catégorielles.

Enfin, il est difficilement concevable que les limites liées au dosage de l'estradiol par RIA direct puissent générer à tort des relations significatives comme celles observées dans notre étude. Il est plus vraisemblable que les erreurs de mesure associées à une large variabilité intra-individuelle de l'estradiol conduisent à une sous-estimation des risques relatifs et contribuent finalement à un manque de puissance (135).

Par ailleurs, au-delà des difficultés de mesure de l'estradiol, il n'est pas exclu que les taux plasmatiques ne soient qu'un faible reflet de la sécrétion hormonale et de l'effet biologique in situ dans les tissus cibles (140, 141).

VI. CONCLUSION

Ce travail de thèse avait pour but d'évaluer la relation entre les estrogènes endogènes et le risque cardiovasculaire chez les femmes ménopausées. A partir d'un schéma cas-cohorte, les données de l'étude prospective 3C ont permis des avancées significatives chez des femmes de plus de 65 ans.

Dans un premier temps, les résultats de notre étude ont montré que l'augmentation de l'estradiol était un nouveau prédicteur du risque cardiovasculaire. De plus, cette association était indépendante des facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels, notamment l'obésité et le diabète connus pour être liés positivement à l'estradiol.

Dans un second temps, nous avons montré que l'association entre le risque artériel ischémique et l'estradiol pouvait être modulée par les polymorphismes des ER. Le risque cardiovasculaire augmentait avec l'élévation de l'estradiol chez les femmes porteuses du génotype *rs9340799-AA* mais pas chez celles avec le génotype *rs9340799-AG/GG*.

Enfin, l'extension du suivi des sujets à 10 ans nous a permis de montrer une relation positive entre les estrogènes endogènes et le risque cardiovasculaire à long terme. Cette association pourrait être liée à une augmentation de l'activité de l'aromatase résultant en une conversion accrue de la testostérone en estradiol.

A partir de ces données, des analyses complémentaires ont montré que les estrogènes pouvaient affecter certains mécanismes impliqués dans l'athérothrombose, notamment l'inflammation et l'hypercoagulabilité. Ces résultats remettent de nouveau en cause le rôle bénéfique des estrogènes sur le cœur et les vaisseaux. Les études à venir devront confirmer cet effet délétère potentiel des estrogènes et établir la nature causale des associations. La généralisation des résultats aux femmes ménopausées plus jeunes devra également être vérifiée.

Ce travail suggère enfin qu'à partir des taux d'estradiol et des caractéristiques génétiques de leurs récepteurs, il pourrait être possible d'identifier un groupe de femmes à risque augmenté de développer une maladie artérielle ischémique. Si ces résultats se confirmaient, une meilleure stratification du risque artériel pourrait être envisagée chez les femmes ménopausées avec des implications potentielles dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

REFERENCES

1. OMS. Principales causes de mortalité dans le monde <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/>. 2012.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014 Jan 21;129(3):e28-e292. PubMed PMID: 24352519.
3. Aouba A, Eb M, Rey G, Pavillon G, Jouglu E. Données sur la mortalité en France: principales causes de décès en 2008 et évolutions depuis 2000. *Bul Epidemiol Hebd*. 2011 (22):249-55.
4. Bethesda MD. National Heart Lung and Blood Institute Incidence and Prevalence: 2006 Chart Book on Cardiovascular and Lung Diseases. 2006.
5. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Flaxman A, et al. The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation*. 2014 Apr 8;129(14):1493-501. PubMed PMID: 24573351. Pubmed Central PMCID: 4181601.
6. Wagner A, Arveiler D, Ruidavets JB, Bingham A, Montaye M, Ferrieres J, et al. Gender- and age-specific trends in coronary heart disease mortality in France from 2000 to 2007: results from the MONICA registers. *European journal of preventive cardiology*. 2014 Jan;21(1):117-22. PubMed PMID: 22718795.
7. Michel P, Odier C, Rutgers M, Reichhart M, Maeder P, Meuli R, et al. The Acute STroke Registry and Analysis of Lausanne (ASTRAL): design and baseline analysis of an ischemic stroke registry including acute multimodal imaging. *Stroke*. 2010 Nov;41(11):2491-8. PubMed PMID: 20930152.
8. Katsiki N, Ntaios G, Vemmos K. Stroke, obesity and gender: a review of the literature. *Maturitas*. 2011 Jul;69(3):239-43. PubMed PMID: 21602002.
9. Petrea RE, Beiser AS, Seshadri S, Kelly-Hayes M, Kase CS, Wolf PA. Gender differences in stroke incidence and poststroke disability in the Framingham heart study. *Stroke*. 2009 Apr;40(4):1032-7. PubMed PMID: 19211484. Pubmed Central PMCID: 2676725.
10. Lofmark U, Hammarstrom A. Evidence for age-dependent education-related differences in men and women with first-ever stroke. Results from a community-based incidence study in northern Sweden. *Neuroepidemiology*. 2007;28(3):135-41. PubMed PMID: 17478968.
11. Huxley RR, Woodward M. Cigarette smoking as a risk factor for coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Lancet*. 2011 Oct 8;378(9799):1297-305. PubMed PMID: 21839503.
12. Packard CJ, Ford I, Robertson M, Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, et al. Plasma lipoproteins and apolipoproteins as predictors of cardiovascular risk and treatment benefit in the PROspective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk (PROSPER). *Circulation*. 2005 Nov 15;112(20):3058-65. PubMed PMID: 16275871.
13. Buse JB, Ginsberg HN, Bakris GL, Clark NG, Costa F, Eckel R, et al. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Circulation*. 2007 Jan 2;115(1):114-26. PubMed PMID: 17192512.

14. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2006 Feb 14;113(6):898-918. PubMed PMID: 16380542.
15. Aslam F, Haque A, Lee LV, Foody J. Hyperlipidemia in older adults. *Clinics in geriatric medicine*. 2009 Nov;25(4):591-606, vii. PubMed PMID: 19944263.
16. Charles MA, et al. ObEpi Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité. 2012.
17. Willey JZ, Moon YP, Kahn E, Rodriguez CJ, Rundek T, Cheung K, et al. Population attributable risks of hypertension and diabetes for cardiovascular disease and stroke in the northern Manhattan study. *Journal of the American Heart Association*. 2014 Oct;3(5):e001106. PubMed PMID: 25227406.
18. Kannel WB. Coronary heart disease risk factors in the elderly. *The American journal of geriatric cardiology*. 2002 Mar-Apr;11(2):101-7. PubMed PMID: 11872968.
19. Emerging Risk Factors C, Wormser D, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Wood AM, Pennells L, et al. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet*. 2011 Mar 26;377(9771):1085-95. PubMed PMID: 21397319. Pubmed Central PMCID: 3145074.
20. Jonsdottir LS, Sigfusson N, Gudnason V, Sigvaldason H, Thorgeirsson G. Do lipids, blood pressure, diabetes, and smoking confer equal risk of myocardial infarction in women as in men? The Reykjavik Study. *Journal of cardiovascular risk*. 2002 Apr;9(2):67-76. PubMed PMID: 12006913.
21. Manolio TA, Pearson TA, Wenger NK, Barrett-Connor E, Payne GH, Harlan WR. Cholesterol and heart disease in older persons and women. Review of an NHLBI workshop. *Annals of epidemiology*. 1992 Jan-Mar;2(1-2):161-76. PubMed PMID: 1342259.
22. WHO. WHO Report on the global tobacco epidemic <http://www.who.int/tobacco/mpower/2008/en/index.html> 2008. Epub (accessed Feb 1, 2011).
23. Hyattsville. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2010: With Special Feature on Death and Dying. <http://www.cdc.gov/nchs/data/health/us/10pdf.pdf>. 2011.
24. Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation*. 1999 Mar 9;99(9):1165-72. PubMed PMID: 10069784.
25. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. *Diabetes care*. 1979 Mar-Apr;2(2):120-6. PubMed PMID: 520114.
26. Kanaya AM, Grady D, Barrett-Connor E. Explaining the sex difference in coronary heart disease mortality among patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Archives of internal medicine*. 2002 Aug 12-26;162(15):1737-45. PubMed PMID: 12153377.
27. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998 May 12;97(18):1837-47. PubMed PMID: 9603539.

28. Empana JP, Ducimetiere P, Arveiler D, Ferrieres J, Evans A, Ruidavets JB, et al. Are the Framingham and PROCAM coronary heart disease risk functions applicable to different European populations? The PRIME Study. *European heart journal*. 2003 Nov;24(21):1903-11. PubMed PMID: 14585248.
29. Scarabin PY, Arveiler D, Amouyel P, Dos Santos C, Evans A, Luc G, et al. Plasma fibrinogen explains much of the difference in risk of coronary heart disease between France and Northern Ireland. The PRIME study. *Atherosclerosis*. 2003 Jan;166(1):103-9. PubMed PMID: 12482556.
30. Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GD, Collins R, Kostis JB, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *Jama*. 2005 Oct 12;294(14):1799-809. PubMed PMID: 16219884. eng.
31. Straczek C, Ducimetiere P, Barberger-Gateau P, Helmer C, Ritchie K, Jouven X, et al. Higher level of systemic C-reactive protein is independently predictive of coronary heart disease in older community-dwelling adults: the three-city study. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2010 Jan;58(1):129-35. PubMed PMID: 20002508. eng.
32. Cook NR, Buring JE, Ridker PM. The effect of including C-reactive protein in cardiovascular risk prediction models for women. *Ann Intern Med*. 2006 Jul;145(1):21-9. PubMed PMID: WOS:000238938400003. English.
33. Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C, et al. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *New England Journal of Medicine*. 2006 Dec;355(25):2631-9. PubMed PMID: WOS:000242956200004. English.
34. Empana JP, Canoui-Poitaine F, Luc G, Juhan-Vague I, Morange P, Arveiler D, et al. Contribution of novel biomarkers to incident stable angina and acute coronary syndrome: the PRIME Study. *European heart journal*. 2008 Aug;29(16):1966-74. PubMed PMID: 18621771.
35. Canoui-Poitaine F, Luc G, Mallat Z, Machez E, Bingham A, Ferrieres J, et al. Systemic chemokine levels, coronary heart disease, and ischemic stroke events: the PRIME study. *Neurology*. 2011 Sep 20;77(12):1165-73. PubMed PMID: 21849651. Pubmed Central PMCID: 3174064.
36. Prugger C, Luc G, Haas B, Arveiler D, Machez E, Ferrieres J, et al. Adipocytokines and the risk of ischemic stroke: the PRIME Study. *Ann Neurol*. 2012 Apr;71(4):478-86. PubMed PMID: 22522440.
37. Prugger C, Luc G, Haas B, Morange PE, Ferrieres J, Amouyel P, et al. Multiple biomarkers for the prediction of ischemic stroke: the PRIME study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013 Mar;33(3):659-66. PubMed PMID: 23329137.
38. Naessen T, Bergquist J, Lind L, Kushnir MM. Higher endogenous estrogen levels in 70-year-old women and men: an endogenous response to counteract developing atherosclerosis? *Menopause-J N Am Menopause Soc*. 2012 Dec;19(12):1322-8. PubMed PMID: WOS:000311830800008. English.
39. Van Helden ML, Meunier JC. Estradiol biodisponible (non-SHBG-bound E 2). Dosage ou calcul en relation avec la densité minérale osseuse lombaire (L1-L4) chez l'homme âgé. *Immuno-Anal Biol Spec*. 2006;21(6):357-64.
40. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Mechanisms of disease - Production and actions of estrogens. *New England Journal of Medicine*. 2002 Jan;346(5):340-52. PubMed PMID: WOS:000173545300008.
41. Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, Reboussin DM, Xu JF, Zheng SL, et al. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density

- lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *New England Journal of Medicine*. 2002 Mar;346(13):967-74. PubMed PMID: WOS:000174608600003.
42. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007 Jul;87(3):905-31. PubMed PMID: WOS:000248378900004. English.
 43. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001 Oct;276(40):36869-72. PubMed PMID: WOS:000171375700003. English.
 44. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine*. 1999 Jun;340(23):1801-11. PubMed PMID: WOS:000080726800006.
 45. Arnal JF, Gourdy P, Elhage R, Garmary-Susini B, Delmas E, Bouchet L, et al. Estrogens and atherosclerosis. *European Journal of Endocrinology*. 2004 Feb;150(2):113-7. PubMed PMID: WOS:000220401800003. English.
 46. Stork S, Bots ML, Grobbee DE, van der Schouw YT. Endogenous sex hormones and C-reactive protein in healthy postmenopausal women. *J Intern Med*. 2008 Sep;264(3):245-53. PubMed PMID: WOS:000258327400004. English.
 47. Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, Bandinelli S, Corsi AM, Giallauria F, et al. SHBG, Sex Hormones, and Inflammatory Markers in Older Women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011 Apr;96(4):1053-9. PubMed PMID: WOS:000289242800048. English.
 48. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*. 2004 Apr 14;291(14):1701-12. PubMed PMID: 15082697. eng.
 49. Lobo RA. Postmenopausal hormones and coronary artery disease: potential benefits and risks. *Climacteric*. 2007 Oct;10 Suppl 2:21-6. PubMed PMID: 17882668. eng.
 50. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002 Apr 17;94(8):606-16. PubMed PMID: 11959894. eng.
 51. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Bastagli L, Montesi F, Pisacane N, et al. Endogenous sex hormones as risk factors for dementia in elderly men and women. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences*. 2007 Sep;62(9):1035-41. PubMed PMID: WOS:000253829000016.
 52. Carcaillon L, Brailly-Tabard S, Ancelin ML, Rouaud O, Dartigues JF, Guiochon-Mantel A, et al. High plasma estradiol interacts with diabetes on risk of dementia in older postmenopausal women. *Neurology*. 2014 Feb 11;82(6):504-11. PubMed PMID: 24477111. eng.
 53. Canonico M, Brailly-Tabard S, Gaussem P, Setiao J, Rouaud O, Ryan J, et al. Endogenous oestradiol as a positive correlate of plasma fibrinogen among older postmenopausal women: a population-based study (the Three-City cohort study). *Clinical endocrinology*. 2012 Dec;77(6):905-10. PubMed PMID: 22642405. eng.
 54. Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, Bandinelli S, Ruggiero C, Guralnik JM, et al. Relationship between higher estradiol levels and 9-year mortality in older women: the Invecchiare in Chianti study. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2009 Oct;57(10):1810-5. PubMed PMID: 19737330. eng.
 55. Rexrode KM, Manson JE, Lee IM, Ridker PM, Sluss PM, Cook NR, et al. Sex hormone levels and risk of cardiovascular events in postmenopausal women. *Circulation*. 2003 Oct 7;108(14):1688-93. PubMed PMID: 12975257. eng.

56. Lee JS, Yaffe K, Lui LY, Cauley J, Taylor B, Browner W, et al. Prospective study of endogenous circulating estradiol and risk of stroke in older women. *Archives of neurology*. 2010 Feb;67(2):195-201. PubMed PMID: 20142527. eng.
57. Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, McDonnell DP, Li X, Hawkins GA, et al. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation*. 2002 Apr 23;105(16):1879-82. PubMed PMID: 11997270. eng.
58. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2006 Mar;116(3):561-70. PubMed PMID: WOS:000235854300002.
59. Saltiki K, Alevizaki M. Coronary heart disease in postmenopausal women; the role of endogenous estrogens and their receptors. *Hormones (Athens, Greece)*. 2007 Jan-Mar;6(1):9-24. PubMed PMID: 17324914. eng.
60. Lluís-Ganella C, Lucas G, Subirana I, Escurriol V, Tomas M, Senti M, et al. Qualitative assessment of previous evidence and an updated meta-analysis confirms lack of association between the ESR1 rs2234693 (PvuII) variant and coronary heart disease in men and women. *Atherosclerosis*. 2009 Dec;207(2):480-6. PubMed PMID: WOS:000273566700030.
61. Molvarec A, Szeplaki G, Kovacs M, Szeplaki Z, Fazakas A, Prohaszka Z, et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) PvuII and XbaI gene polymorphisms in ischemic stroke in a Hungarian population. *Clinica Chimica Acta*. 2007 Jul;382(1-2):100-5. PubMed PMID: WOS:000247710700018.
62. Munshi A, Sharma V, Kaul S, Al-Hazzani A, Alshatwi AA, Manohar VR, et al. Estrogen receptor alpha genetic variants and the risk of stroke in a South Indian population from Andhra Pradesh. *Clinica Chimica Acta*. 2010 Nov;411(21-22):1817-21. PubMed PMID: WOS:000282562200045.
63. Rexrode KM, Ridker PM, Hegener HH, Buring JE, Manson JE, Zee RYL. Polymorphisms and haplotypes of the estrogen receptor-beta gene (ESR2) and cardiovascular disease in men and women. *Clinical Chemistry*. 2007 Oct;53(10):1749-56. PubMed PMID: WOS:000249879200005.
64. Markoula S, Milionis H, Lazaros L, Spengos K, Vassilopoulou S, Chatzistefanidis D, et al. Associations of ESR2 AluI (G/A) polymorphism with ischemic stroke in Caucasians. *Journal of the Neurological Sciences*. 2012 May;316(1-2):126-30. PubMed PMID: WOS:000303177900024.
65. Group CS. Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City Study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology*. 2003 Nov-Dec;22(6):316-25. PubMed PMID: 14598854.
66. CNHIM. Centre national hospitalier d'information sur le médicament. www.theriaque.org. 2002.
67. WHO. WHO BMI classification http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html. 2004.
68. Prentice RL. On the design of synthetic case-control studies. *Biometrics*. 1986 Jun;42(2):301-10. PubMed PMID: 3741972. eng.
69. Nambi V, Hoogeveen RC, Chambless L, Hu Y, Bang H, Coresh J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and high-sensitivity C-reactive protein improve the stratification of ischemic stroke risk in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke*. 2009 Feb;40(2):376-81. PubMed PMID: 19095974. eng.
70. Farhat GN, Cummings SR, Chlebowski RT, Parimi N, Cauley JA, Rohan TE, et al. Sex hormone levels and risks of estrogen receptor-negative and estrogen receptor-positive breast cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. Apr 6;103(7):562-70. PubMed PMID: 21330633. eng.

71. Newton KM, LaCroix AZ, Heckbert SR, Abraham L, McCulloch D, Barlow W. Estrogen therapy and risk of cardiovascular events among women with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2003 Oct;26(10):2810-6. PubMed PMID: 14514584. eng.
72. Carcaillon L, Gaussem P, Ducimetiere P, Giroud M, Ritchie K, Dartigues JF, et al. Elevated plasma fibrin D-dimer as a risk factor for vascular dementia: the Three-City cohort study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009 Dec;7(12):1972-8. PubMed PMID: WOS:000272130500003.
73. Sjoval J, Vihko R. Determination of androsterone and dehydroepiandrosterone sulfates in human serum by gas-liquid chromatography. *Steroids*. 1965 Nov;6(5):597-604. PubMed PMID: 4223036.
74. Abraham GE. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 beta. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1969 Jun;29(6):866-70. PubMed PMID: 5783587.
75. Stanczyk FZ, Jurow J, Hsing AW. Limitations of direct immunoassays for measuring circulating estradiol levels in postmenopausal women and men in epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Apr;19(4):903-6. PubMed PMID: 20332268. eng.
76. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 Jun;18(6):499-502. PubMed PMID: 4337382.
77. Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, Spaft C, Ducimetiere P, Ritchie K, et al. Increased Thrombin Generation Is Associated With Acute Ischemic Stroke but Not With Coronary Heart Disease in the Elderly The Three-City Cohort Study. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2011 Jun;31(6):1445-51. PubMed PMID: WOS:000290719200030.
78. Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, Hermann H, Fichter M, Mayer H, et al. Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: Identification of several genetic variants. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998 Dec;83(12):4524-7. PubMed PMID: WOS:000077359400059. English.
79. Jeng MH, Shupnik MA, Bender TP, Westin EH, Bandyopadhyay D, Kumar R, et al. Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells. *Endocrinology*. 1998 Oct;139(10):4164-74. PubMed PMID: WOS:000076038100019. English.
80. Milewicz A, Krzyzanowska-Swiniarska B, Miazgowski T, Jedrzejuk D, Arkowska A, Mieszczanowicz U, et al. The reference values of sex hormones and SHBG serum levels in subjects over 65 years old - The PolSenior Study. *Endokrynol Pol*. 2013;64(2):82-93. PubMed PMID: WOS:000320462700002. English.
81. Lee JS, Ettinger B, Stanczyk FZ, Vittinghoff E, Hanes V, Cauley JA, et al. Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006 Oct;91(10):3791-7. PubMed PMID: WOS:000241100900015. English.
82. Lewontin RC. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics*. 1964 Jan;49(1):49-67. PubMed PMID: 17248194. eng.
83. Tregouet DA, Garelle V. A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2007 Apr 15;23(8):1038-9. PubMed PMID: 17308338. eng.
84. Barlow WE. Robust variance estimation for the case-cohort design. *Biometrics*. 1994 Dec;50(4):1064-72. PubMed PMID: 7786988. eng.

85. Self SGPRL. Asymptotic distribution theory and efficiency results for case-cohort studies *Ann Stat.* 1988;16:64-81.
86. Korn EL, Graubard BI, Midthune D. Time-to-event analysis of longitudinal follow-up of a survey: choice of the time-scale. *American journal of epidemiology.* 1997 Jan 1;145(1):72-80. PubMed PMID: 8982025. eng.
87. Thiebaut AC, Benichou J. Choice of time-scale in Cox's model analysis of epidemiologic cohort data: a simulation study. *Statistics in medicine.* 2004 Dec 30;23(24):3803-20. PubMed PMID: 15580597. eng.
88. Commenges D, Letenneur L, Joly P, Alioum A, Dartigues JF. Modelling age-specific risk: application to dementia. *Statistics in medicine.* 1998 Sep 15;17(17):1973-88. PubMed PMID: 9777690. eng.
89. Rubin D. Multiple imputation for non response in surveys. New-York: Wiley. 1987.
90. Barrett-Connor E, Goodman-Gruen D. Prospective study of endogenous sex hormones and fatal cardiovascular disease in postmenopausal women. *BMJ (Clinical research ed.* 1995 Nov 4;311(7014):1193-6. PubMed PMID: 7488894. eng.
91. Nilsson SE, Fransson E, Brismar K. Relationship between serum progesterone concentrations and cardiovascular disease, diabetes, and mortality in elderly Swedish men and women: An 8-year prospective study. *Gender medicine.* 2009 Sep;6(3):433-43. PubMed PMID: 19850239.
92. Chen Y, Zeleniuch-Jacquotte A, Arslan AA, Wojcik O, Toniolo P, Shore RE, et al. Endogenous hormones and coronary heart disease in postmenopausal women. *Atherosclerosis.* 2011 Jun;216(2):414-9. PubMed PMID: 21367421. eng.
93. Naessen T, Sjogren U, Bergquist J, Larsson M, Lind L, Kushnir MM. Endogenous steroids measured by high-specificity liquid chromatography-tandem mass spectrometry and prevalent cardiovascular disease in 70-year-old men and women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2010 Apr;95(4):1889-97. PubMed PMID: 20164295.
94. Laughlin GA, Goodell V, Barrett-Connor E. Extremes of endogenous testosterone are associated with increased risk of incident coronary events in older women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012 Feb;95(2):740-7. PubMed PMID: 19934360. eng.
95. Patel SM, Ratcliffe SJ, Reilly MP, Weinstein R, Bhasin S, Blackman MR, et al. Higher serum testosterone concentration in older women is associated with insulin resistance, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2009 Dec;94(12):4776-84. PubMed PMID: 19846742. eng.
96. Sievers C, Klotsche J, Pieper L, Schneider HJ, Marz W, Wittchen HU, et al. Low testosterone levels predict all-cause mortality and cardiovascular events in women: a prospective cohort study in German primary care patients. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies.* Oct;163(4):699-708. PubMed PMID: 20685832. eng.
97. Schuit SCE, Oei HHS, Witteman JCM, van Kessel CHG, van Meurs JBJ, Nijhuis RL, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction. *Jama-Journal of the American Medical Association.* 2004 Jun;291(24):2969-77. PubMed PMID: WOS:000222184600026.
98. Lu H, Higashikata T, Inazu A, Nohara A, Yu WX, Shimizu M, et al. Association of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms with coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology.* 2002 May;22(5):817-23. PubMed PMID: WOS:000175511700020.

99. Matsubara Y, Murata M, Kawano K, Zama T, Aoki N, Yoshino H, et al. Genotype distribution of estrogen receptor polymorphisms in men and postmenopausal women from healthy and coronary populations and its relation to serum lipid levels. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 1997 Nov;17(11):3006-12. PubMed PMID: WOS:A1997YL00800092.
100. Kjaergaard AD, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Axelsson CK, Gronholdt MLM, Grande P, et al. Estrogen receptor alpha polymorphism and risk of cardiovascular disease, cancer, and hip fracture - Cross-sectional, cohort, and case-control studies and a meta-analysis. *Circulation*. 2007 Feb;115(7):861-71. PubMed PMID: WOS:000244273700011.
101. Rossouw J, Bray P, Liu JM, Kooperberg C, Hsia J, Lewis C, et al. Estrogen Receptor Polymorphisms and the Vascular Effects of Hormone Therapy. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2011 Feb;31(2):464-U33. PubMed PMID: WOS:000286376800034.
102. Onland-Moret NC, van Gils CH, Roest M, Grobbee DE, Peeters PH. The estrogen receptor alpha gene and breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control*. 2005 Dec;16(10):1195-202. PubMed PMID: 16215870. eng.
103. Spratt DI, Longcope C, Cox PM, Bigos ST, Wilbur-Welling C. Differential changes in serum concentrations of androgens and estrogens (in relation with cortisol) in postmenopausal women with acute illness. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1993 Jun;76(6):1542-7. PubMed PMID: 8501162.
104. Spratt DI, Morton JR, Kramer RS, Mayo SW, Longcope C, Vary CP. Increases in serum estrogen levels during major illness are caused by increased peripheral aromatization. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2006 Sep;291(3):E631-8. PubMed PMID: 16670151.
105. Dossett LA, Swenson BR, Heffernan D, Bonatti H, Metzger R, Sawyer RG, et al. High levels of endogenous estrogens are associated with death in the critically injured adult. *The Journal of trauma*. 2008 Mar;64(3):580-5. PubMed PMID: 18332796. Pubmed Central PMCID: 2654263.
106. Goodman-Gruen D, Barrett-Connor E. Sex differences in the association of endogenous sex hormone levels and glucose tolerance status in older men and women. *Diabetes care*. 2000 Jul;23(7):912-8. PubMed PMID: 10895840.
107. Kalish GM, Barrett-Connor E, Laughlin GA, Gulanski BI, Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention T. Association of endogenous sex hormones and insulin resistance among postmenopausal women: results from the Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention Trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003 Apr;88(4):1646-52. PubMed PMID: 12679451.
108. Brand JS, Chan MF, Dowsett M, Folkerd E, Wareham NJ, Luben RN, et al. Cigarette smoking and endogenous sex hormones in postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011 Oct;96(10):3184-92. PubMed PMID: 21832108.
109. Masi CM, Hawkey LC, Xu X, Veenstra TD, Cacioppo JT. Serum estrogen metabolites and systolic blood pressure among middle-aged and older women and men. *American journal of hypertension*. 2009 Nov;22(11):1148-53. PubMed PMID: 19713943. Pubmed Central PMCID: 2766426.
110. Kuller LH, Gutai JP, Meilahn E, Matthews KA, Plantinga P. Relationship of endogenous sex steroid hormones to lipids and apoproteins in postmenopausal women. *Arteriosclerosis*. 1990 Nov-Dec;10(6):1058-66. PubMed PMID: 2123088.

111. Shelley JM, Green A, Smith AM, Dudley E, Dennerstein L, Hopper J, et al. Relationship of endogenous sex hormones to lipids and blood pressure in mid-aged women. *Annals of epidemiology*. 1998 Jan;8(1):39-45. PubMed PMID: 9465992.
112. Labrie F. INTRACRINOLOGY. *Mol Cell Endocrinol*. 1991 Jul;78(3):C113-C8. PubMed PMID: WOS:A1991FW23200003. English.
113. Diano S, Horvath TL, Mor G, Register T, Adams M, Harada N, et al. Aromatase and estrogen receptor immunoreactivity in the coronary arteries of monkeys and human subjects. *Menopause-J N Am Menopause Soc*. 1999 Spr;6(1):21-8. PubMed PMID: WOS:000079153500006. English.
114. Simpson ER, Misso M, Hewitt KN, Hill RA, Boon WC, Jones ME, et al. Estrogen--the good, the bad, and the unexpected. *Endocrine reviews*. 2005 May;26(3):322-30. PubMed PMID: 15817672.
115. Murakami H, Harada N, Sasano H. Aromatase in atherosclerotic lesions of human aorta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001 Dec;79(1-5):67-74. PubMed PMID: WOS:000174669800010. English.
116. Wedren S, Lovmar L, Humphreys K, Magnusson C, Melhus H, Syvanen AC, et al. Oestrogen receptor alpha gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study. *Breast Cancer Res*. 2004;6(4):R437-R49. PubMed PMID: WOS:000222828200029. English.
117. Wang J, Higuchi R, Modugno F, Li J, Umblas N, Lee J, et al. Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Dec;106(2):273-80. PubMed PMID: WOS:000250579600013. English.
118. Ashton KA, Proietto A, Otton G, Symonds I, McEvoy M, Attia J, et al. Estrogen receptor polymorphisms and the risk of endometrial cancer. *Bjog*. 2009 Jul;116(8):1053-61. PubMed PMID: WOS:000266813300006. English.
119. Brandi ML, Becherini L, Gennari L, Racchi M, Bianchetti A, Nacmias B, et al. Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Nov;265(2):335-8. PubMed PMID: WOS:000083899100012. English.
120. Isoe-Wada K, Maeda M, Yong J, Adachi Y, Harada H, Urakami K, et al. Positive association between an estrogen receptor gene polymorphism and Parkinson's disease with dementia. *Eur J Neurol*. 1999 Jul;6(4):431-5. PubMed PMID: WOS:000081443000004. English.
121. Jeedigunta Y, Reddy PRB, Kolla VK, Munshi A, Ananthapur V, Narasimulu G, et al. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with BMD and their affect on estradiol levels in pre- and postmenopausal women in south Indian population from Andhra Pradesh (vol 411, pg 597, 2010). *Clinica Chimica Acta*. 2010 Sep;411(17-18):1394-. PubMed PMID: WOS:000280033400047. English.
122. Albagha OME, McGuigan FEA, Reid DM, Ralston SH. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: Haplotype analysis in women from the United Kingdom. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001 Jan;16(1):128-34. PubMed PMID: WOS:000165955200017. English.
123. Carcaillon L, Garcia-Garcia FJ, Tresguerres JAF, Avila GG, Kireev R, Rodriguez-Manas L. Higher Levels of Endogenous Estradiol are Associated with Frailty in Postmenopausal Women from the Toledo Study for Healthy Aging. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012 Aug;97(8):2898-906. PubMed PMID: WOS:000307457400076.
124. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Jan 15;314(1):1-16. PubMed PMID: 19682539.

125. Zhao Y, Nichols JE, Valdez R, Mendelson CR, Simpson ER. Tumor necrosis factor- α stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an activating protein-1 binding site upstream of promoter 1.4. *Molecular endocrinology*. 1996 Nov;10(11):1350-7. PubMed PMID: 8923461.
126. Salama SA, Kamel MW, Diaz-Arrastia CR, Xu X, Veenstra TD, Salih S, et al. Effect of tumor necrosis factor- α on estrogen metabolism and endometrial cells: potential physiological and pathological relevance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009 Jan;94(1):285-93. PubMed PMID: 18957495. Pubmed Central PMCID: 2630861.
127. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*. 2007 Apr;56(4):1010-3. PubMed PMID: 17287468.
128. Mysliwska J, Rutkowska A, Hak L, Siebert J, Szyndler K, Rachon D. Inflammatory response of coronary artery disease postmenopausal women is associated with the IVS1-397T > C estrogen receptor α polymorphism. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*. 2009 Mar;130(3):355-64. PubMed PMID: 19008156. eng.
129. Folsom AR, Golden SH, Boland LL, Szklo M. Association of endogenous hormones with C-reactive protein, fibrinogen, and white blood count in post-menopausal women. *Eur J Epidemiol*. 2005;20(12):1015-22. PubMed PMID: 16331433.
130. Borisssoff JJ, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *The New England journal of medicine*. 2011 May 5;364(18):1746-60. PubMed PMID: 21542745.
131. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. 2000 Feb;148(2):209-14. PubMed PMID: 10657556.
132. Pinzone JJ, Stevenson H, Strobl JS, Berg PE. Molecular and cellular determinants of estrogen receptor α expression. *Mol Cell Biol*. 2004 Jun;24(11):4605-12. PubMed PMID: WOS:000221536600001. English.
133. Gavin KM, Seals DR, Silver AE, Moreau KL. Vascular Endothelial Estrogen Receptor α Is Modulated by Estrogen Status and Related to Endothelial Function and Endothelial Nitric Oxide Synthase in Healthy Women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009 Sep;94(9):3513-20. PubMed PMID: WOS:000269584600051. English.
134. Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, et al. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999 Sep;43(4):985-91. PubMed PMID: WOS:000082376700020. English.
135. Rosner W, Hankinson SE, Sluss PM, Vesper HW, Wierman ME. Challenges to the Measurement of Estradiol: An Endocrine Society Position Statement. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013 Apr;98(4):1376-87. PubMed PMID: WOS:000317195600038.
136. Rinaldi S, Dechaud H, Biessy C, Morin-Raverot V, Toniolo P, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. Reliability and validity of commercially available, direct radioimmunoassays for measurement of blood androgens and estrogens in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Jul;10(7):757-65. PubMed PMID: 11440961.
137. McShane LM, Dorgan JF, Greenhut S, Damato JJ. Reliability and validity of serum sex hormone measurements. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996 Nov;5(11):923-8. PubMed PMID: 8922302.
138. Dorgan JF, Fears TR, McMahon RP, Aronson Friedman L, Patterson BH, Greenhut SF. Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of

- radioimmunoassay and mass spectrometry. *Steroids*. 2002 Mar;67(3-4):151-8. PubMed PMID: 11856538.
139. Endogenous H, Breast Cancer Collaborative G, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW, et al. Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. *British journal of cancer*. 2011 Aug 23;105(5):709-22. PubMed PMID: 21772329. Pubmed Central PMCID: 3188939.
 140. Wei CD, Zheng HY, Wu W, Dai W, Tong YQ, Wang M, et al. Meta-Analysis of the Association of the Rs2234693 and Rs9340799 Polymorphisms of Estrogen Receptor Alpha Gene with Coronary Heart Disease Risk in Chinese Han Population. *International Journal of Medical Sciences*. 2013;10(4):457-66. PubMed PMID: WOS:000315564800016.
 141. James VH, McNeill JM, Beranek PA, Bonney RC, Reed MJ. The role of tissue steroids in regulating aromatase and oestradiol 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in breast and endometrial cancer. *Journal of steroid biochemistry*. 1986 Nov;25(5B):787-90. PubMed PMID: 3807364. eng.

ARTICLES

High Level of Plasma Estradiol as a New Predictor of Ischemic Arterial Disease in Older Postmenopausal Women: The Three-City Cohort Study

Valérie Scarabin-Carré, Marianne Canonico, Sylvie Brailly-Tabard, Séverine Trabado, Pierre Ducimetière, Maurice Giroud, Joanne Ryan, Catherine Helmer, Geneviève Plu-Bureau, Anne Guiochon-Mantel and Pierre-Yves Scarabin

J Am Heart Assoc 2012, 1:

doi: 10.1161/JAHA.112.001388

JAHA: Journal of the American Heart Association is published by the American Heart Association. 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2012 American Heart Association. All rights reserved. Online ISSN: 2047-9980

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://jaha.ahajournals.org/content/1/3/e001388>

Subscriptions, Permissions, and Reprints: The Journal of the American Heart Association is an online only open access publication. Visit the Journal at <http://jaha.ahajournals.org> for more information.

High Level of Plasma Estradiol as a New Predictor of Ischemic Arterial Disease in Older Postmenopausal Women: The Three-City Cohort Study

Valérie Scarabin-Carré, MD*; Marianne Canonico, PhD*; Sylvie Brailly-Tabard, MD; Séverine Trabado, MD; Pierre Ducimetière, PhD; Maurice Giroud, MD; Joanne Ryan, PhD; Catherine Helmer, MD, PhD; Geneviève Plu-Bureau, MD, PhD; Anne Guiochon-Mantel, MD, PhD; Pierre-Yves Scarabin, MD, MSc

Background—Despite evidence that estrogens may be involved in atherothrombosis, the role of endogenous sex steroid hormones in ischemic arterial disease among postmenopausal women remains uncertain.

Methods and Results—In the Three-City prospective cohort study of subjects ($n=9294$) >65 years of age, we investigated the association of total 17β -estradiol, bioavailable 17β -estradiol, and total testosterone with the 4-year incidence of ischemic arterial disease among postmenopausal women who did not use any hormone therapy. We designed a case-cohort study including a random sample of 537 subjects and 106 incident cases of first cardiovascular events. Weighted Cox proportional-hazards models with age as the time scale were used to estimate hazard ratios (HRs) and corresponding 95% confidence intervals (CIs) for ischemic arterial disease by a 1-standard deviation increase in sex steroid hormones. In univariate analysis, HR of ischemic arterial disease was positively and significantly associated with both total and bioavailable estradiol levels. These associations remained significant after adjustment for traditional cardiovascular risk factors, including body mass index, diabetes, hypercholesterolemia, hypertension, and smoking status (HR: 1.42, 95% CI: 1.12–1.79, $P<0.01$; and HR: 1.42, 95% CI: 1.12–1.78, $P<0.01$, respectively). Separate analysis for coronary heart disease yielded similar results (adjusted HR: 1.49, 95% CI: 1.10–2.02, $P=0.01$; and adjusted HR: 1.50, 95% CI: 1.11–2.04, $P<0.01$, respectively), and a borderline significant trend was observed for ischemic stroke (HR: 1.34, 95% CI: 0.95–1.89, $P=0.08$; and HR: 1.32, 95% CI: 0.94–1.84, $P=0.11$, respectively). By contrast, no significant association was found between total testosterone and ischemic arterial disease in both univariate and adjusted analyses.

Conclusions—High plasma level of endogenous estradiol emerges as a new predictor of ischemic arterial disease in older postmenopausal women. (*J Am Heart Assoc.* 2012;1:e001388 doi: 10.1161/JAHA.112.001388.)

Key Words: hormones • women • cardiovascular diseases • risk factors

Incidence of coronary heart disease (CHD) is lower in women than men of the same age.^{1,2} The gap between

the 2 sexes closes after menopause, when CHD rates rise sharply and cardiovascular disease becomes the leading cause of death among women. It therefore has been hypothesized that women's CHD advantage could be due to the protective effects of estrogens. Animal studies and observational studies have suggested that the use of postmenopausal hormone therapy (HT) could be beneficial with regard to the development of CHD.^{3–5} However, large prevention trials showed an increased risk of stroke in HT users and failed to confirm any estrogen-related cardioprotective effect.^{6–8} Nevertheless, a re-analysis of the Women's Health Initiative data recently has suggested that the timing of hormone initiation might influence the HT effect on CHD risk, with a decrease in CHD risk for women using HT close to menopause and a higher risk in older HT users.

Despite extensive biological research on the cardiovascular effects of estrogens,⁹ few studies have investigated whether endogenous sex steroid hormones (SSHs) could affect the risk of ischemic arterial disease among postmenopausal women.

From the Centre for Research in Epidemiology and Population Health, Inserm Unit 1018, Hormones and Cardiovascular Disease (V.S., M.C., G.P.-B., P.-Y.S.), and Université Paris-Sud, UMR-S 1018 (V.S., M.C., P.D., P.-Y.S.), Villejuif; Service de Génétique moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre (S.B.-T., S.T., A.G.-M.); INSERM UMR-S693, Université Paris-Sud, Institut Fédératif de Recherche de Bicêtre (S.B.-T., S.T., A.G.-M.); University Hospital and Faculty of Medicine of Dijon and EA 4184, University of Burgundy (M.G.); INSERM Unit 1061, University Montpellier (J.R.); INSERM Unit U897, Victor Segalen University, Bordeaux (C.H.); and Université Paris Descartes, Paris (G.P.-B.), France

*Drs Valérie Scarabin and Marianne Canonico contributed equally to this article.

Correspondence to: Pierre-Yves Scarabin, MD, MSc, 16 av. Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif Cedex. E-mail pierre-yves.scarabin@inserm.fr

Received March 1, 2012; accepted April 24, 2012.

© 2012. The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley-Blackwell. This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Previous data failed to provide evidence for an independent role of estradiol levels in determining CHD and stroke risk among postmenopausal women.^{10–13} Nevertheless, endogenous estradiol levels are positively related to cardiovascular risk factors such as obesity,¹⁴ dyslipidemia,^{15–17} diabetes,^{18,19} and C-reactive protein^{20,21} in postmenopausal women. In this context, we hypothesized that high levels of endogenous SSHs could be deleterious with regard to the risk of arterial disease among older postmenopausal women. Using the data from the Three-City (3C) cohort study, we therefore investigated the association of endogenous estradiol and testosterone with the risk of CHD and ischemic stroke among women >65 years of age.

Methods

Population Study

The 3C study is a large ongoing French prospective cohort study that aims to evaluate the risk of dementia attributable to vascular disorders. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Kremlin-Bicêtre, and written informed consent was obtained from all participants. A detailed methodology of the study has been described previously.²² Briefly, 3649 men and 5645 women >65 years of age registered on electoral rolls and not institutionalized were recruited in 3 French cities (Bordeaux, Dijon, and Montpellier) between 1999 and 2001. Baseline data were collected by trained psychologists or nurses using standardized questionnaires during a face-to-face interview at home or at the study center. These data included information on sociodemographic characteristics, education, medical history, medication use, food consumption, and alcohol and tobacco use. Information on HT use was collected with a specific questionnaire. Women were classified as current HT users if they had used HT at any time during the 3 months before inclusion; otherwise they were classified as past users or never users. Systolic and diastolic blood pressure, weight, and height were assessed during a physical examination.

Baseline Covariates

Smoking status was studied in 3 categories (never, past, and current). Body mass index (BMI) was calculated by dividing weight by height in meters squared. Hypertension status was defined as a high blood pressure measurement (systolic blood pressure ≥ 140 mm Hg and/or diastolic blood pressure ≥ 90 mm Hg), antihypertensive therapy at baseline, or both. Glycemia status was considered “diabetes” if the fasting glycemia value at inclusion was ≥ 1.26 g/L (7.00 mmol/L), the patient was receiving treatment for diabetes, or both. Glycemia status was “high glycemia” if the fasting glycemia value at inclusion was between 1.10 and 1.26 g/L (6.10 and 7.00 mmol/L)

and was “normal glycemia” if the fasting glycemia value at inclusion was <1.10 g/L (6.10 mmol/L). Hypercholesterolemia was considered present if the cholesterol level was >2.40 g/L at baseline, the subject was treated for hypercholesterolemia, or both. Waist-hip ratio was calculated by dividing the waist circumference by the hip circumference.

Follow-Up and Events Ascertainment

After baseline examination, subjects have been reexamined at home or at the study center every 2 years for the detection of cardiovascular events and dementia. For the present analysis, we used data collected over the 4-year follow-up.

Ischemic arterial disease consisted of either CHD or ischemic stroke during the follow-up. CHD was defined as a hospitalization for either stable or unstable angina pectoris, coronary dilatation, artery bypass, myocardial infarction, or definite CHD death. All CHD events were adjudicated by a medical committee. Nonfatal CHD events were validated by using hospital charts and practitioners' reports. CHD deaths were validated by reviewing hospital records, medical data obtained from family physicians or specialists, and proxy interviews (coded I210 to I219, I251 to I259, I461, and R960 according to the *International Classification of Diseases*, 10th edition), as previously described.²³ Stroke events were adjudicated within an independent group of experts and were defined as a rapid onset of a neurological deficit lasting >24 hours and confirmed by a lesion compatible with an acute stroke on computed tomography or magnetic resonance imaging of the brain. A review of brain imaging allowed further classification of strokes as ischemic or hemorrhagic events. The present analysis focuses on ischemic strokes. For subjects who presented both CHD and ischemic stroke during follow-up, we used the first cardiovascular event that occurred.

Case-Cohort Study

Recently, a case-cohort study has been set up from the 3C study to investigate the association of blood biomarkers with cardiovascular risk and dementia. In brief, a case-cohort design consists of a random subsample of the original cohort together with all incident cases of this cohort. In practice, 1264 subjects were randomly selected from the initial cohort after stratification by study center, sex, age, and the presence of a baseline plasma sample. From the 759 selected women, we excluded women who were current HT users at inclusion ($n=120$). To investigate the risk of a first ischemic arterial disease event, we also excluded women with a personal history of CHD or stroke at inclusion ($n=86$). Finally, we excluded women without any follow-up data ($n=16$). Among these 537 remaining postmenopausal women, 15 incident cases of ischemic arterial disease were validated during the 4-year follow-up. With the same exclusion criteria applied, all incident

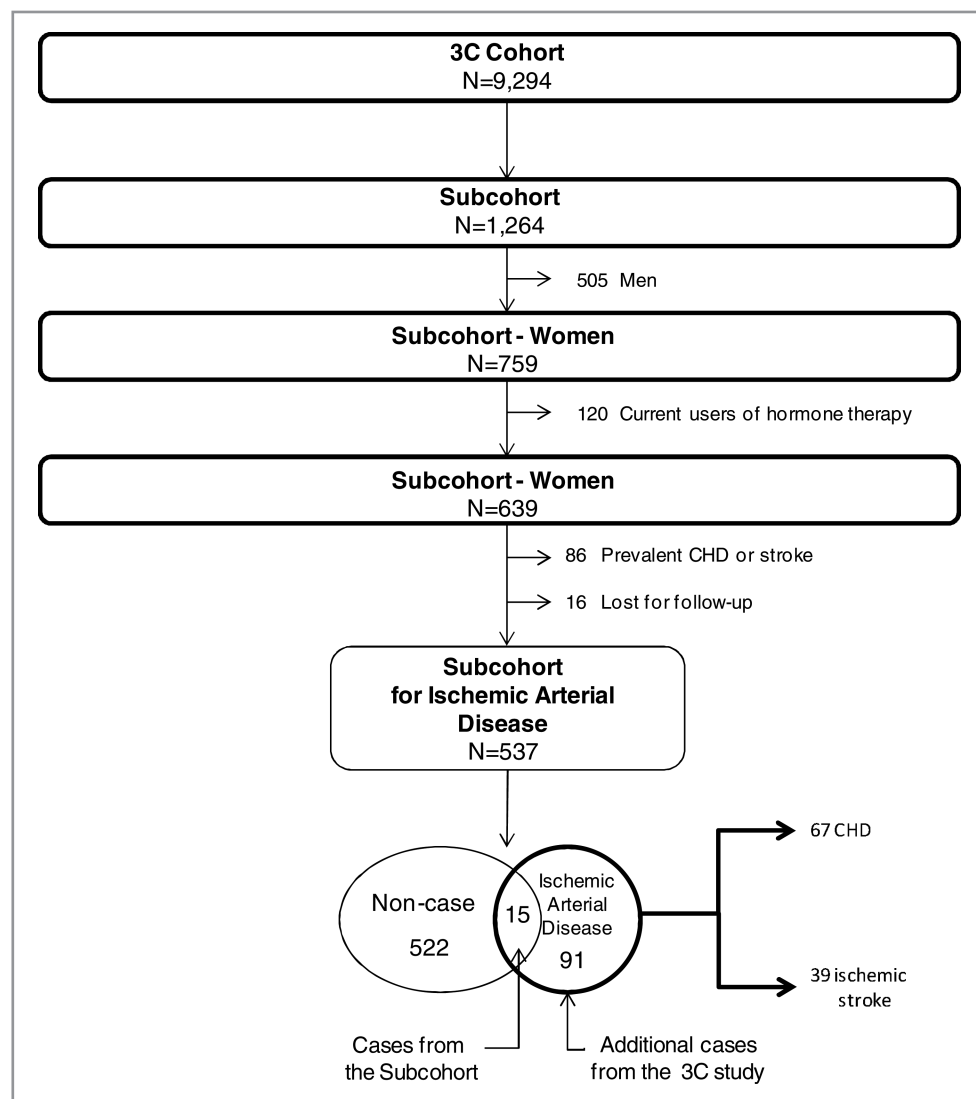


Figure. Flowchart representing the constitution of the case-cohort study for the investigation of the risk of ischemic arterial disease, CHD, and stroke in relation to sex hormone levels.

cases outside the subcohort were added ($n=91$). The final population sample therefore consisted of 522 noncases and 106 incident cases of a first ischemic arterial disease event, including 67 CHD events and 39 ischemic strokes (Figure).

Blood Collection and Hormone Measurements

At baseline, blood samples were collected for $>90\%$ of the full cohort. Plasma samples were available for all the subjects included in the case-cohort study. EDTA plasmas were obtained after 1 centrifugation at 3000g and were immediately stored at -80°C in 1-mL plastic tubes.

Plasma total estradiol was measured by a sensitive direct radioimmunoassay (RIA) with an Orion Diagnostica device (Spectria, Espoo, Finland). The minimum detectable concentration was 2 pg/mL (7.3 pmol/L), and a value of 0.6 pg/mL was

arbitrarily assigned to all women with a non-detectable estradiol concentration. The intra-assay and interassay coefficients of variation were 17.6% and 18.1%, respectively, for a total estradiol concentration of 3.2 pg/mL (12 pmol/L) and were 2.8% and 5.8%, respectively, for a total estradiol concentration of 24 pg/mL. Bioavailable estradiol was assessed by differential precipitation of hormones bound to globulins with 50% ammonium sulfate after equilibration of the plasma sample with [^3H]-estradiol and plasma total estradiol determination. Total and bioavailable estradiol were highly correlated to each other ($r=0.98$, $P<0.01$).

Plasma total testosterone was measured by a direct RIA as total estradiol on an Orion Diagnostica device (Spectria, Espoo, Finland). The minimum detectable concentration was 0.02 ng/mL (0.06 nmol/L), and the

intra-assay and interassay coefficients of variation were 7.5% and 7.0%, respectively, for a total testosterone concentration of 0.46 and 0.35 ng/mL (1.6 and 1.2 nmol/L), respectively.

Statistical Analyses

Baseline characteristics of subjects are displayed as frequencies for categorical variables and arithmetic means and standard deviations (SDs) for continuous variables that presented a normal distribution. Variables with a positively skewed distribution were log-transformed, and values were expressed as geometric means and interquartile ranges. Baseline characteristics of cases and noncases were compared by χ^2 test and 2-tailed Student t test. The association of cardiovascular disease with total estradiol, bioavailable estradiol, and testosterone was assessed by using weighted Cox proportional-hazards

models. Such models included a modification of the standard errors on the basis of robust variance estimates to take into account the case-cohort design, as previously described.^{24,25} In addition, because age is sharply associated to arterial disease, age was used as the time scale, as recommended.²⁶ Each model presented met the proportional-hazards assumption. Hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were estimated for a 1-SD increase in the log-transformed SSH distribution. In addition, SSH distributions were divided into quartiles (Q1–Q4), and we estimated the risk of cardiovascular disease for each group compared with Q1 as the reference group. Tests for linear trend across the 4 categories of SSH levels were used to assess the significance of the variables in the models after having tested the linearity of the associations. To assess the linearity of the relation between SSH levels and ischemic arterial disease risk, we used tests based on the difference in the log-likelihood between 2 models of prediction (one with 3 dummy variables corresponding to the quartile of the parameter distribution, and the other including the qualitative ordinal variable in 4 categories). All tests were not significant, and thus we did not reject the hypothesis of linearity. Nonlinear (U-shaped) relations were also investigated with the use of quadratic terms in the Cox models. The risks of cardiovascular disease were assessed in an age-adjusted analysis and then were adjusted for study center and traditional cardiovascular risk factors (BMI, diabetes, hypercholesterolemia, hypertension, and smoking status). Finally, these multivariable analyses were further adjusted for waist-hip ratio. Data were missing for BMI and waist-hip ratio for 1% and 9% of subjects, respectively. Because adiposity is known to influence both the risk of ischemic arterial disease and estradiol levels, we used multiple imputations for missing data.²⁷ The multiple-imputation prediction models included all variables in the conceptual framework. Five imputed data sets were created and analyzed together. The results were combined with Rubin's rules.²⁸

Primary analyses focused on arterial ischemic disease, including both CHD and ischemic stroke. Then, subgroup analyses including only the first arterial event were performed separately for each vascular outcome. Using the same exclusion criteria among women free of arterial disease at baseline, we studied the risk of CHD among a subsample of 522 noncases and 67 incident cases. Similarly, the risk of ischemic stroke was estimated from a population consisting of 522 noncases and 39 incident events (Figure).

To determine whether certain subgroups of women were at particularly high or low risk for ischemic arterial disease, Cox proportional-hazards analyses were stratified according to the baseline levels of cardiovascular risk factors, and the consistency of hormone-related HRs was assessed by formal tests of interactions in the whole sample.

Statistical analyses were performed with the Statistical Analysis System software version 9.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC).

Results

Of the 106 women who experienced cardiovascular events, there were 25 myocardial infarctions, including 10 fatal events; 12 instances of angina pectoris; 25 coronary dilatations; 5 artery bypasses; and 39 ischemic strokes.

Characteristics of cases and noncases are presented in Table 1. Mean age at inclusion was higher among cases than noncase subjects (76.6 and 74.3 years, respectively). In addition, cases of ischemic arterial disease were more likely than noncases to have diabetes (20.7% and 6.7%, respectively) and hypertension (86.8% and 76.3%, respectively). With regard to SSH concentrations, the mean value of total estradiol was significantly higher among cases than noncases (6.05 and 5.19 pg/mL, respectively), and similar results were observed for bioavailable estradiol (4.04 and 3.48 pg/mL, respectively). By contrast, there was no significant difference in mean testosterone levels between cases and noncases (0.28 and 0.29 ng/mL, respectively).

Table 2 shows the risk of ischemic arterial disease, CHD, and ischemic stroke in relation to total estradiol, bioavailable estradiol, and testosterone levels. In age-adjusted analysis, the risk of ischemic arterial disease was positively and significantly associated with total and bioavailable estradiol. HRs and 95% CIs for ischemic arterial disease per 1-SD increase in total and bioavailable estradiol distribution were 1.39 (1.13–1.72) and 1.38 (1.12–1.70), respectively, and subjects with the highest levels of estradiol (Q4) had an increased risk of ischemic arterial disease as compared to subjects with the lowest levels of estradiol (HR: 1.99, 95% CI: 1.06–3.73, *P* for linear trend=0.02 for total estradiol; and HR: 2.22, 95% CI: 1.18–4.20, *P* for linear trend=0.02 for bioavailable estradiol). Adjustment for study center and traditional cardiovascular risk factors, including BMI, diabetes, hypercholesterolemia, hypertension, and smoking status, slightly attenuated these associations. HRs and 95% CIs for a 1-SD increase were 1.42 (1.12–1.79) and 1.42 (1.12–1.78) for total and bioavailable estradiol, respectively, and HRs and 95% CIs of Q4 versus Q1 were 1.99 (0.96–4.10) and 2.19 (1.05–4.56) for total and bioavailable estradiol, respectively. Further adjustment for waist-hip ratio made no substantial changes to the results: 1.37 (1.07–1.74) and 1.36 (1.07–1.73) for total and bioavailable estradiol, respectively. Separate analysis for CHD (*n*=67 events) yielded similar results (adjusted HR: 1.49, 95% CI: 1.10–2.02, *P*=0.01; and adjusted HR: 1.50, 95% CI: 1.11–2.04, *P*<0.01, respectively), and a borderline significant trend was observed for ischemic stroke (*n*=39 events) (HR: 1.34, 95% CI: 0.95–1.89, *P*=0.08; and HR: 1.32, 95% CI: 0.94–1.84, *P*=0.11, respectively). Stratified analyses showed

Table 1. Baseline Characteristics and Plasma SSH Levels Among Cases of Ischemic Arterial Disease and Noncase Subjects in the 3C Case-Cohort Study

Characteristic	Noncases (n=522)	Ischemic Arterial Disease Cases* (n=106)	P [†]
Age, y, mean±SD	74.3±5.3	76.6±5.7	<0.01
Study center, n (%)			0.38
Bordeaux	120 (23.0)	31 (29.3)	
Dijon	269 (51.5)	51 (48.1)	
Montpellier	133 (25.5)	24 (22.6)	
Education level, n (%)			0.55
Less than grade school	206 (39.5)	42 (39.6)	
Grade school or high school	154 (29.5)	36 (34.0)	
High school validated or university	162 (31.0)	28 (26.4)	
BMI [‡] , kg/m ² , mean±SD	25.6±4.8	26.5±4.7	0.10
Glycemia [§] , n (%)			<0.01
Normal glycemia	466 (89.5)	80 (75.5)	
High glycemia	20 (3.8)	4 (3.8)	
Diabetes	35 (6.7)	22 (20.7)	
Hypertension, n (%)	398 (76.3)	92 (86.8)	0.02
Hypercholesterolemia, n (%)	330 (63.2)	70 (66.0)	0.58
Smoking, n (%)			0.83
Never	427 (81.8)	86 (81.1)	
Past	70 (13.4)	16 (15.1)	
Current	25 (4.8)	4 (3.8)	
Age at menopause , y, mean±SD	49.4±5.6	48.6±6.1	0.17
Type of menopause [#] , n (%)			0.74
Natural	421 (81.4)	84 (79.2)	
Bilateral oophorectomy	41 (7.9)	8 (7.6)	
Other	55 (10.7)	14 (13.2)	
SSHs, geometric mean (interquartile range)			
Total estradiol, pg/mL	5.19 (3.47–7.91)	6.05 (4.42–9.22)	<0.01
Bioavailable estradiol, pg/mL	3.48 (2.28–5.63)	4.04 (2.69–6.40)	<0.01
Total testosterone, ng/mL	0.29 (0.21–0.45)	0.28 (0.20–0.44)	0.49

*Including 67 CHD and 39 stroke events.

[†]P value obtained from Student *t* tests or χ^2 tests except for SSHs, where Cox model was used.[‡]Two missed values, [§]1 missed value, ^{||}6 missed values, [#]5 missed values.

similar HRs for ischemic arterial disease by cardiovascular risk factors, including BMI, diabetes, hypercholesterolemia, and hypertension. For example, no risk modification related to obesity or diabetes was found. The HRs (95% CIs) of ischemic arterial disease for a 1-SD increase of total estradiol were 1.26 (1.02–

1.55) and 1.28 (0.79–2.08) in the nonobese and obese (BMI >30 kg/m²) women, respectively, and 1.21 (0.99–1.49) and 1.37 (0.78–2.39) in the nondiabetic and diabetic women, respectively.

Finally, we conducted sensitivity analyses with exclusion of past HT users (102 noncases and 18 cases), women who started HT during the follow-up (2 noncases and 1 case), or events that occurred during the first year of follow-up (21 cases). Overall, no substantial change in the association of SSH levels with ischemic arterial disease was observed (data not shown).

With regard to testosterone, both age-adjusted and fully adjusted analyses showed no significant association with the risk of ischemic arterial disease (for 1-SD increase in testosterone distribution: HR: 0.93; 95% CI: 0.76–1.14; and HR: 0.91, 95% CI: 0.72–1.15, respectively). There was no significant U-shaped relationship between testosterone and the risk for ischemic arterial disease. Total testosterone was not associated with the risk of CHD and ischemic stroke separately.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to show a positive association between plasma estradiol levels and the risk of both CHD and ischemic stroke among postmenopausal women >65 years of age. These associations were independent of traditional cardiovascular risk factors such as diabetes and BMI. By contrast, plasma levels of testosterone were not significantly related to the risk of arterial ischemic disease.

Few studies have evaluated the association between endogenous estrogens and risk of ischemic arterial disease. The Rancho Bernardo Study of 651 postmenopausal women with a mean age of 66 years who were not using HT failed to show any association of total and bioavailable estradiol levels with the risk of death from ischemic heart disease.¹⁰ Nevertheless, a recent study found that elevated endogenous estradiol levels could predict risk of all-cause death in older postmenopausal women.²⁹ However, cardiovascular death was not investigated in this study. In a nested case-control design among postmenopausal women not using HT, crude and adjusted analyses based on 115 incident cases of combined ischemic arterial disease, similar to our primary outcome, showed no association between estradiol levels and cardiovascular risk.^{11,13} More recently, another cohort study of 99 CHD events reported an increased risk of CHD among women with high estradiol concentrations. Nevertheless, this association disappeared after adjustment for BMI and other cardiovascular risk factors.¹³ In these 2 latter studies, postmenopausal women were younger than those included in our cohort, and this difference in age, as well as a lack of statistical power, may partly explain the diverging results in the association of SSH levels with CHD risk. Finally, our findings are consistent with the recent results from

Table 2. HRs of Ischemic Arterial Disease, CHD, and Stroke Events by SSH Level in Postmenopausal Women of the 3C Case-Cohort Study

	Ischemic Arterial Disease*							CHD							Ischemic Stroke						
		Age Adjusted			Adjusted [‡]				Age Adjusted			Adjusted [‡]				Age Adjusted			Adjusted [‡]		
	No. of							No. of							No. of						
SSH Level	Events	HR	95% CI	<i>P</i> [†]	HR	95% CI	<i>P</i> [†]	Events	HR	95% CI	<i>P</i> [†]	HR	95% CI	<i>P</i> [†]	Events	HR	95% CI	<i>P</i> [†]	HR	95% CI	<i>P</i> [†]
Total estradiol, pg/mL																					
For 1 SD log	106	1.39	(1.13–1.72)	<0.01	1.42	(1.12–1.79)	<0.01	67	1.43	(1.11–1.86)	<0.01	1.49	(1.10–2.02)	0.01	39	1.35	(0.95–1.92)	0.08	1.34	(0.95–1.89)	0.08
Q1 <3.51	19	1	[reference]	0.02	1	[reference]	<0.05	12	1	[reference]	0.07	1	[reference]	0.12	7	1	[reference]	0.10	1	[reference]	0.13
Q2 [3.51–5.27]	20	1.33	(0.66–2.66)		1.46	(0.70–3.09)		14	1.46	(0.62–3.42)		1.55	(0.61–3.93)		6	1.09	(0.35–3.35)		1.30	(0.40–4.26)	
Q3 [5.27–7.83]	31	1.71	(0.91–3.23)		1.84	(0.90–3.76)		19	1.71	(0.77–3.78)		1.72	(0.70–4.25)		12	1.75	(0.67–4.58)		2.17	(0.73–6.46)	
Q4 ≥7.83	36	1.99	(1.06–3.73)		1.99	(0.96–4.10)		22	1.98	(0.90–4.35)		2.08	(0.81–5.32)		14	2.00	(0.77–5.15)		1.95	(0.70–5.42)	
Bioavailable estradiol, pg/mL																					
For 1 SD log	106	1.38	(1.12–1.70)	<0.01	1.42	(1.12–1.78)	<0.01	67	1.45	(1.11–1.88)	<0.01	1.50	(1.11–2.04)	<0.01	39	1.30	(0.93–1.82)	0.13	1.32	(0.94–1.84)	0.11
Q1 <2.32	18	1	[reference]	0.02	1	[reference]	0.05	12	1	[reference]	0.05	1	[reference]	0.10	6	1	[reference]	0.18	1	[reference]	0.20
Q2 [2.32–3.56]	25	1.83	(0.92–3.63)		2.03	(0.96–4.26)		15	1.66	(0.70–3.94)		1.76	(0.68–4.54)		10	2.56	(0.91–7.19)		2.93	(0.98–8.76)	
Q3 [3.56–5.49]	26	1.73	(0.89–3.35)		1.90	(0.90–3.98)		16	1.58	(0.70–3.58)		1.63	(0.64–4.15)		10	1.84	(0.63–5.34)		2.38	(0.77–7.38)	
Q4 ≥5.49	37	2.22	(1.18–4.20)		2.19	(1.05–4.56)		24	2.20	(1.01–4.80)		2.26	(0.89–5.69)		13	2.26	(0.83–6.16)		2.22	(0.76–6.52)	
Total testosterone, ng/mL																					
For 1 SD log	106	0.93	(0.76–1.14)	0.49	0.91	(0.72–1.15)	0.42	67	0.91	(0.72–1.15)	0.44	0.89	(0.67–1.18)	0.42	39	0.95	(0.68–1.33)	0.76	0.93	(0.65–1.40)	0.69
Q1 <0.23	34	1	[reference]	0.76	1	[reference]	0.33	22	1	[reference]	0.60	1	[reference]	0.42	12	1	[reference]	0.77	1	[reference]	0.61
Q2 [0.23–0.33]	21	0.71	(0.39–1.30)		0.67	(0.36–1.26)		12	0.61	(0.28–1.31)		0.56	(0.25–1.27)		9	0.98	(0.38–2.55)		0.98	(0.35–2.70)	
Q3 [0.33–0.45]	25	1.03	(0.56–1.87)		0.95	(0.49–1.85)		17	0.98	(0.49–1.98)		0.95	(0.42–2.14)		8	0.81	(0.30–2.22)		0.85	(0.31–2.29)	
Q4 ≥0.45	26	0.83	(0.47–1.47)		0.70	(0.37–1.32)		16	0.73	(0.36–1.48)		0.61	(0.26–1.40)		10	0.92	(0.38–2.24)		0.81	(0.31–2.08)	

*Including 67 CHD and 39 stroke events.

[†]*P* value for continuous variable and *P* for trend for variable in quartiles.

[‡]Model adjusted for study center, BMI, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, and smoking status.

a prospective study that reported a positive association between the free estradiol index and the risk of atherothrombotic stroke (196 incident cases) among postmenopausal women >65 years of age.¹² However, potential mediators included dyslipidemia and insulin resistance, whereas our data showed an independent association between elevated estradiol levels and ischemic arterial disease.

The existence of an independent association between high levels of endogenous estradiol and the risk of ischemic arterial disease among older women does not necessarily imply that this relationship is causal. Nevertheless, estradiol may affect several mechanisms that may be involved in atherothrombosis. Adipose aromatization of testosterone represents the main source of estradiol production in women after cessation of ovarian activity. Therefore, obese women were more likely than lean ones to present high levels of estradiol.^{14,30,31} Both adipose tissue and high levels of endogenous estradiol have been associated with a low-grade inflammation state that can be a mechanism for mediating the association of estradiol with ischemic arterial disease.^{20,32,33} In our study, adjustment for BMI and waist-hip ratio did not substantially modify the association of estradiol with cardiovascular disease. Nevertheless, BMI and waist-hip ratio may be an indirect assessment of fat mass, and therefore, we cannot exclude this mechanism. Further prospective data including baseline measurement of fat mass are required. Insulin resistance and diabetes also could explain our results because both have been consistently related to high levels of endogenous estradiol among postmenopausal women without HT.^{18,19,34} However, in our study, adjustment for diabetes slightly modified the increased cardiovascular risk associated with high endogenous estradiol levels. Changes in the lipid profile could be another mechanism for mediating the association of estradiol with the risk of arterial ischemic disease. However, data on the effects of endogenous estradiol on lipids remain somewhat conflicting. Although early investigations suggested a positive association of estradiol levels with high-density lipoprotein cholesterol,³⁵ recent findings have indicated a deleterious lipid profile among postmenopausal women with the highest levels of estradiol. Indeed, it has been shown that estradiol and estrone were positively associated with triglycerides,¹⁶ low-density lipoprotein cholesterol,¹⁷ and total cholesterol¹⁵ and were negatively associated with high-density lipoprotein cholesterol.¹⁶ Finally, procoagulant effects of estrogens may represent a central mechanism in the increased risk of cardiovascular disease in postmenopausal women with high estradiol levels. It recently has been shown that thrombin generation time, a hypercoagulability marker, could have an important role in the etiology of ischemic arterial disease, especially among women in the elderly.^{36,37} Thus, we can hypothesize that the association of estradiol with ischemic arterial disease is partly mediated by deleterious changes in hemostasis. However, data relating en-

dogenous estradiol levels and hemostatic variables in postmenopausal women are required. Overall, better understanding of the mediators of estradiol effects is still needed, and further mechanisms remain to be investigated, especially with regard to the effect of endogenous estradiol on atherogenesis and endothelial function in older postmenopausal women.

Data on the role of testosterone in cardiovascular disease are scarce and remain conflicting. One study has found that low levels of total testosterone were an independent risk factor for CHD among postmenopausal women.³⁸ In addition, other data showed that low levels of testosterone could predict both all-cause and cardiovascular death among older women.³⁹ By contrast, the Women's Health Study reported that a high free androgen index was related to an increased risk of ischemic arterial disease in postmenopausal women without HT, but this association was not independent of traditional cardiovascular risk factors.¹¹ More recently, the Cardiovascular Health Study reported an association of high testosterone levels with the risk of CHD among older postmenopausal women.⁴⁰ In addition, the same investigation showed that testosterone was positively associated with some cardiovascular risk factors, such as insulin resistance and metabolic syndrome.⁴⁰ This latest result was concordant with an earlier study that found a positive and significant association of free testosterone with the degree of coronary artery disease among postmenopausal women.⁴¹ In our study, neither age-adjusted nor fully adjusted analyses displayed an association between testosterone and the risk of ischemic arterial disease in older women. We cannot exclude the possibility that the inconsistency in previous findings and absence of association in our study could be due to heterogeneity in vascular disease outcomes, population characteristics (eg, age, health status), and hormone measurements between studies.

Our study has several strengths. First, the 3C study is a prospective and multicenter study with a high participation rate during the 4 years of follow-up. In addition, baseline data, including detailed information on HT use, were collected by standardized questionnaires during a face-to-face interview. Moreover, hormone measurements were conducted without knowledge of the case/noncase status via a RIA method, giving only 8% of values under the minimum detectable concentration.⁴² Finally, incident cases of CHD and stroke were carefully validated by 2 independent committees of experts using medical documentation.

The main limitation of our study is the small number of incident cases, which may yield a lack of statistical power, especially for subgroup analyses and for testing potential interactions of SSH levels with cardiovascular risk factors on ischemic arterial disease. In addition, this study included older women with a high prevalence of cardiovascular risk factors, especially hypertension, and therefore our results cannot be generalized to healthy younger postmenopausal women. With

regard to the SSH assays, especially at low levels of estradiol in postmenopausal women, conventional RIAs with preceding purification steps would provide more reliable and accurate measurements of plasma estradiol as compared with direct RIA.⁴³ However, measurement error related to direct RIA would bias our analysis toward the null hypothesis, resulting in a potential underestimation of the true associations.

In conclusion, a high level of endogenous estradiol emerges as a new significant predictor of the risk of ischemic arterial disease among postmenopausal women older than 65 years. However, further investigations are needed to confirm these results and to assess the role of endogenous SSHs in cardiovascular disease, especially in younger postmenopausal women without cardiovascular risk factors.

Acknowledgments

The 3C Study is conducted under a partnership agreement between the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Victor Segalen-Bordeaux II University, and Sanofi-Aventis. We thank Julie Setiao for her excellent technical assistance.

Sources of Funding

The Fondation pour la Recherche Médicale funded preparation and initiation of the study. The 3C Study is also supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés, Direction Générale de la Santé, Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale, Institut de la Longévité, Conseils Régionaux of Aquitaine and Bourgogne, Fondation de France, and Ministry of Research-Institut National Santé Et Recherche Médicale (INSERM) Programme "Cohortes et collections de données biologiques." The experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Biological assays for hemostatic and hormone parameters were supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2007-LVIE-005-01).

Disclosures

None.

References

- Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J*. 1986;111:383-390.
- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokoskoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations: monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999;353:1547-1557.
- Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, Koritnik DR, Parks JS, Wolfe MS, Clarkson TB. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys: lack of an effect of added progesterone. *Arteriosclerosis*. 1990;10:1051-1057.
- Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996;335:453-461.
- Arnal JF, Douin-Echinard V, Bouchet L, Tremolieres F, Laurell H, Lenfant F, Gadeau AP, Guery JC, Gourdy P. Understanding the oestrogen action in experimental and clinical atherosclerosis. *Fundam Clin Pharmacol*. 2006;20:539-548.
- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA*. 1998;280:605-613.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288:321-333.
- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B, Chlebowski R, Curb D, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix S, Howard BV, Hsia J, Hubbell A, Jackson R, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller L, LaCroix AZ, Lane D, Langer RD, Lasser N, Lewis CE, Manson J, Margolis K, Ockene J, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Ritenbaugh C, Robbins J, Rossouw JE, Sarto G, Stefanick ML, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Wallace R, Wassertheil-Smoller S. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291:1701-1712.
- Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340:1801-1811.
- Barrett-Connor E, Goodman-Gruen D. Prospective study of endogenous sex hormones and fatal cardiovascular disease in postmenopausal women. *BMJ*. 1995;311:1193-1196.
- Rexrode KM, Manson JE, Lee IM, Ridker PM, Sluss PM, Cook NR, Buring JE. Sex hormone levels and risk of cardiovascular events in postmenopausal women. *Circulation*. 2003;108:1688-1693.
- Lee JS, Yaffe K, Lui LY, Cauley J, Taylor B, Browner W, Cummings S. Prospective study of endogenous circulating estradiol and risk of stroke in older women. *Arch Neurol*. 2010;67:195-201.
- Chen Y, Zeleniuch-Jacquotte A, Arslan AA, Wojcik O, Toniolo P, Shore RE, Levitz M, Koenig KL. Endogenous hormones and coronary heart disease in postmenopausal women. *Atherosclerosis*. 2011;216:414-419.
- Baglietto L, English DR, Hopper JL, MacInnis RJ, Morris HA, Tilley WD, Krishnan K, Giles GG. Circulating steroid hormone concentrations in postmenopausal women in relation to body size and composition. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115:171-179.
- Mudali S, Dobs AS, Ding J, Cauley JA, Szklo M, Golden SH. Endogenous postmenopausal hormones and serum lipids: the atherosclerosis risk in communities study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:1202-1209.
- Lambrinoudaki I, Christodoulakos G, Rizo D, Economou E, Argeitis J, Vlachou S, Creatas M, Kouskouni E, Botsis D. Endogenous sex hormones and risk factors for atherosclerosis in healthy Greek postmenopausal women. *Eur J Endocrinol*. 2006;154:907-916.
- Vaidya D, Dobs A, Gapstur SM, Golden SH, Hankinson A, Liu K, Ouyang P. The association of endogenous sex hormones with lipoprotein subfraction profile in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Metabolism*. 2008;57:782-790.
- Ding EL, Song Y, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Liu S. Plasma sex steroid hormones and risk of developing type 2 diabetes in women: a prospective study. *Diabetologia*. 2007;50:2076-2084.
- Golden SH, Dobs AS, Vaidya D, Szklo M, Gapstur S, Kopp P, Liu K, Ouyang P. Endogenous sex hormones and glucose tolerance status in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:1289-1295.
- Stork S, Bots ML, Grobbee DE, van der Schouw YT. Endogenous sex hormones and C-reactive protein in healthy postmenopausal women. *J Intern Med*. 2008;264:245-253.
- Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, Bandinelli S, Corsi AM, Giallauria F, Guralnik JM, Zuliani G, Cattabiani C, Parrino S, Ablandi F, Dall'aglio E, Ceresini G, Basaria S, Ferrucci L. SHBG, sex hormones, and inflammatory markers in older women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:1053-1059.
- Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City Study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology*. 2003;22:316-325.
- 3C Study Group. Alperovitch A, Bertrand M, Jouglu E, Vidal JS, Ducimetiere P, Helmer C, Ritchie K, Pavillon G, Tzourio C. Do we really know the cause of death of the very old? Comparison between official mortality statistics and cohort study classification. *Eur J Epidemiol*. 2009;24:669-675.
- Barlow WE. Robust variance estimation for the case-cohort design. *Biometrics*. 1994;50:1064-1072.

25. Barlow WE, Ichikawa L, Rosner D, Izumi S. Analysis of case-cohort designs. *J Clin Epidemiol*. 1999;52:1165–1172.
26. Korn EL, Graubard BI, Midthune D. Time-to-event analysis of longitudinal follow-up of a survey: choice of the time-scale. *Am J Epidemiol*. 1997;145(l):72–80.
27. Janssen KJ, Donders AR, Harrell FE, Jr., Vergouwe Y, Chen Q, Grobbee DE, Moons KG. Missing covariate data in medical research: to impute is better than to ignore. *J Clin Epidemiol*. 63(7):721–727.
28. Rubin D. Multiple Imputation for Non Response in Surveys. New-York: Wiley; 1987.
29. Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, Bandinelli S, Ruggiero C, Guralnik JM, Metter EJ, Ling SM, Paolisso G, Valenti G, Cappola AR, Ferrucci L. Relationship between higher estradiol levels and 9-year mortality in older women: the Invecchiare in Chianti study. *J Am Geriatr Soc*. 2009;57:1810–1815.
30. Mahabir S, Baer DJ, Johnson LL, Hartman TJ, Dorgan JF, Campbell WS, Clevidence BA, Taylor PR. Usefulness of body mass index as a sufficient adiposity measurement for sex hormone concentration associations in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:2502–2507.
31. McTiernan A, Wu L, Chen C, Chlebowski R, Mossavar-Rahmani Y, Modugno F, Perri MG, Stanczyk FZ, Van Horn L, Wang CY. Relation of BMI and physical activity to sex hormones in postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:1662–1677.
32. Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*. 2007;18:240–245.
33. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;314:1–16.
34. Kalyani RR, Franco M, Dobs AS, Ouyang P, Vaidya D, Bertoni A, Gapstur SM, Golden SH. The association of endogenous sex hormones, adiposity, and insulin resistance with incident diabetes in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:4127–4135.
35. Kuller LH, Gutai JP, Meilahn E, Matthews KA, Plantinga P. Relationship of endogenous sex steroid hormones to lipids and apoproteins in postmenopausal women. *Arteriosclerosis*. 1990;10:1058–1066.
36. Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, Spaft C, Ducimetiere P, Ritchie K, Dartigues JF, Scarabin PY. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1445–1451.
37. Carcaillon L, Gaussem P, Ducimetiere P, Giroud M, Ritchie K, Dartigues JF, Scarabin PY. Elevated plasma fibrin D-dimer as a risk factor for vascular dementia: the Three-City cohort study. *J Thromb Haemost*. 2009;7(12):1972–1978.
38. Laughlin GA, Goodell V, Barrett-Connor E. Extremes of endogenous testosterone are associated with increased risk of incident coronary events in older women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:740–747.
39. Sievers C, Klotsche J, Pieper L, Schneider HJ, Marz W, Wittchen HU, Stalla GK, Mantzoros C. Low testosterone levels predict all-cause mortality and cardiovascular events in women: a prospective cohort study in German primary care patients. *Eur J Endocrinol*. 2010;163:699–708.
40. Patel SM, Ratcliffe SJ, Reilly MP, Weinstein R, Bhasin S, Blackman MR, Cauley JA, Sutton-Tyrrell K, Robbins J, Fried LP, Cappola AR. Higher serum testosterone concentration in older women is associated with insulin resistance, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:4776–4784.
41. Phillips GB, Pinkernell BH, Jing TY. Relationship between serum sex hormones and coronary artery disease in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:695–701.
42. Hsing AW, Stanczyk FZ, Belanger A, Schroeder P, Chang L, Falk RT, Fears TR. Reproducibility of serum sex steroid assays in men by RIA and mass spectrometry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(5):1004–1008.
43. Stanczyk FZ, Jurow J, Hsing AW. Limitations of direct immunoassays for measuring circulating estradiol levels in postmenopausal women and men in epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(4):903–906.

Plasma Estrogen Levels, Estrogen Receptor Gene Variation, and Ischemic Arterial Disease in Postmenopausal Women: The Three-City Prospective Cohort Study

Valérie Scarabin-Carré, Sylvie Brailly-Tabard, Marie-Laure Ancelin, Cécilia Maubaret, Anne Guiochon-Mantel, Marianne Canonico,* and Pierre-Yves Scarabin*

Center for Research in Epidemiology and Population Health (V.S.-C., M.C., P.-Y.S.), Unité 1018, Department of Hormones and Cardiovascular Disease, 94807 Villejuif, France; Unité Mixte de Recherche en Santé 1018 (V.S.-C., M.C., P.-Y.S.), Université Paris-Sud, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France; Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique, et Hormonologie (S.B.-T., A.G.-M.), Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France; INSERM Unité Mixte de Recherche en Santé 693 (S.B.-T., A.G.-M.), Université Paris-Sud, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France; INSERM Unité 1061 (M.-L.A.), University Montpellier, 34493 Montpellier, France; INSERM (C.M.), Institut de Santé Publique, d'Épidémiologie et de Développement, Center Unité 897, Department of Epidemiology-Biostatistic, 33076 Bordeaux, France; and Université Bordeaux (C.M.), 33076 Bordeaux, France

Background: In older postmenopausal women, high levels of endogenous estrogen have been related to adverse health outcomes including ischemic arterial disease (IAD). Whether estrogen receptor- α (*ESR1*) and - β (*ESR2*) polymorphisms modulate the effects of estrogens on IAD has not been investigated.

Methods: In the Three-City prospective cohort study among subjects older than 65 years, we used a case-cohort design in which plasma levels of total and bioavailable 17β -estradiol were measured. After exclusion of postmenopausal women using hormone therapy, a random subcohort of 533 women and 105 incident cases of first IAD events over 4 years of follow-up were analyzed. Five common polymorphisms of *ESR1* and *ESR2* were genotyped. Hazard ratios (HRs) of IAD for a 1-SD increase in hormones levels by the genotypes were estimated from Cox models after adjustment for cardiovascular risk factors and a correction for multiple testing. We also investigated the role of hemostasis and inflammation as potential mediators.

Results: Neither estrogens nor IAD risk was significantly associated with estrogen receptor polymorphisms. Overall, IAD risk increased with total estradiol [HR 1.40, 95% confidence interval (CI) 1.11–1.77]. Stratified analysis by genotypes showed that total estradiol was positively related to IAD risk in women with *ESR1* rs9340799-AA genotype but not in women with the AG/GG genotype (HR 1.62, 95% CI 1.22–2.17 and HR 1.03, 95% CI 0.81–1.30, respectively; *P* for interaction <.05). An additional adjustment for hemostatic variables reduced the HR by about one third in women carrying the rs9340799-AA genotype (HR 1.41, 95% CI 1.06–1.90).

Conclusion: The *ESR1* rs9340799 genotype may modify the IAD risk related to high endogenous estrogens levels in older postmenopausal women. Hypercoagulability may act as a mediator. (*J Clin Endocrinol Metab* 99: E1539–E1546, 2014)

Few epidemiological studies have been conducted to assess the association between circulating levels of endogenous estradiol and the risk of chronic diseases in postmenopausal women (1). Despite an important estrogen deficiency in postmenopausal women, high plasma estradiol levels have been related to several adverse health outcomes including breast cancer (2), dementia (3), frailty (4), and all-cause mortality (5). In addition, previous data reported a positive relation of endogenous estrogens with coronary heart disease (CHD) (6, 7) and stroke (8), but these associations were not independent of traditional cardiovascular risk factors such as diabetes and body mass index (BMI). In a recent study, we found that the high plasma level of endogenous estrogens was an independent predictor of ischemic arterial disease (IAD) in older postmenopausal women (9).

Estrogens exert their actions via two distinct types of estrogen receptors (ER) (ER- α and ER- β), encoded by the ER- α gene (*ESR1*) located on chromosome 6 and the ER- β gene (*ESR2*) located on chromosome 14, respectively. ERs are expressed in many tissues, especially in vascular endothelial and smooth muscle cells of cerebral and coronary arteries, and may play a role in the development of cardiovascular disease (10, 11). Previous studies suggested that both *rs2234693* and *rs9340799* single-nucleotide polymorphisms might influence the expression of *ESR1* (12) and affect the function of estrogens on arterial disease including CHD and stroke (13, 14). However, a recent meta-analysis concluded to a lack of association between *ESR1* polymorphisms and CHD (15). Conflicting results about the association of *ESR1* polymorphisms with the risk of stroke have been also reported (16, 17). Similarly, data on the association of *ESR2* polymorphisms (including *rs1256049* and *rs1271572*) with the risk of CHD or stroke have been inconsistent (18, 19).

Despite the potential role of estrogens and their receptors in the development of IAD, no study has evaluated whether ER polymorphisms could modulate the effects of estrogens on IAD. Therefore, we investigated the risk of CHD and ischemic stroke related to endogenous estrogens levels by *ESR1* and *ESR2* polymorphisms in a cohort study among postmenopausal women over 65 years, who did not use hormone therapy (HT). In addition, because estradiol is known to be associated with hemostatic and inflammation parameters (20, 21), their role was evaluated as potential mediators in the association of both estrogens and ER polymorphisms with IAD risk.

Materials and Methods

Population study

The Three-City (3C) study is a large ongoing French prospective cohort designed to evaluate the risk of dementia,

CHD, and stroke in subjects older than 65 years. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Kremlin-Bicêtre, and a written informed consent was obtained for all participants. A detailed methodology of the study has been previously described (22). Briefly, 3649 men and 5645 women, not institutionalized, registered on electoral rolls in three French cities (Bordeaux, Dijon, and Montpellier), were recruited between 1999 and 2001. At baseline, each participant was interviewed using standardized questionnaires and underwent a clinical examination to measure blood pressure, weight, and height.

Baseline covariates

Information on sociodemographic characteristics, education, medical history, medication use, smoking status, and consumption of alcohol were systematically collected at baseline. If HT was prescribed at any time during the 3 months before the beginning of the follow-up, women were considered as current users. Traditional cardiovascular risk factors including BMI, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, and smoking status were defined as previously described (9).

Follow-up and event ascertainment

Every 2 years after inclusion, the participants have been reexamined for the detection of dementia and IAD events. For this study, we focused on data collected over the 4-year follow-up. IAD consisted of either CHD or ischemic stroke during the follow-up. These events were adjudicated within an independent group of experts using medical documentation. Details of the ascertainment of CHD and stroke have been described (9). Briefly, CHD was defined as a hospitalization for angina pectoris, coronary dilatation, artery bypass, myocardial infarction, or CHD death. Stroke events were confirmed by brain imaging.

Case-cohort study

A case-cohort study was designed from the 3C study to investigate the association of blood biomarkers with cardiovascular risk and dementia (23). The case-cohort study design was firstly described by Prentice (24) and consists of a random sample of the original cohort together with all incidents cases of this cohort. Advantages of case-cohort vs nested case-control design have been described (25). In practice, after exclusion of men ($n = 1264$), current users of HT ($n = 120$), women with a personal history of CHD or stroke at baseline ($n = 86$), and those lost to follow-up ($n = 16$), the subcohort consisted of 537 women with 522 noncases and 15 incidents cases of IAD. Using the same exclusion criteria, all validated incident cases outside the subcohort were added ($n = 91$). The detailed flow chart has been described (9). Data on all ER polymorphisms were missing for five subjects. The final sample therefore consisted of 533 women in the subcohort and 105 incident cases of a first IAD event (14 from subcohort and 91 outside subcohort) including 67 CHD and 38 ischemic strokes.

Blood collection and laboratory methods

At baseline, blood samples were collected for more than 90% of the full cohort. Plasma samples were available for all the subjects included in the case-cohort study. EDTA plasmas were obtained after one centrifugation at $3000 \times g$ and immediately stored at -80°C in 1-mL plastic tubes.

Plasma total estradiol was measured by a sensitive direct RIA with 2 pg/mL (7.3 pmol/L) as the limit of quantitation. Bioavailable estradiol was assessed as reported (9).

DNA was extracted from white blood cells (Puregene kit; QIAGEN) and stored at -80°C . Genotyping of ER polymorphisms was performed by Kbiosciences using their competitive allele-specific PCR single-nucleotide polymorphism genotyping system (KASPar). Fluorescence scanning in a BMG Labtech Pherastar scanner analyzed the amplified PCR products, and the results were interpreted with KlusterCaller 1.1 software (LGC Group). The error rate for the KASPar assay system is less than 0.3% (26). The two most commonly studied *ESR1* polymorphisms were investigated: *rs2234693* and *rs9340799* (otherwise known as *PvuII* and *XbaI*), which are located at position 397 and 351 of intron 1, respectively. Three *ESR2* polymorphisms were genotyped: *rs1256049* (otherwise known as *RsaI*), *rs4986938* (otherwise known as *AluI*), and *rs1271572*, which are located in position 1082 of exon 5, in position 1730 of the 3'-untranslated region of exon 8 and in the promoter region, respectively. The selection of these polymorphisms was based on previously published associations with risk of CHD and stroke (15, 17, 18) and possible functional significance (12, 27, 28).

Hemostatic variables including fibrinogen, von Willebrand factor, fibrin D-dimer and thrombin generation, and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) have been assessed as described (23, 29, 30).

Statistical analyses

χ^2 tests were used to compare the distribution of ER genotypes with those predicted under the Hardy-Weinberg equilibrium in the subcohort. Pairwise linkage disequilibrium between the different polymorphisms was analyzed by using Thesias software in the subcohort (31).

Baseline characteristics of all subjects in the subcohort are presented as frequencies for categorical variables and arithmetic means with SDs for continuous variables that presented a normal distribution. Variables with a positive skewed distribution were log transformed, and values are expressed as geometric means and interquartile ranges. Baseline characteristics of subjects in the subcohort were compared by *rs9340799* genotypes using χ^2 tests and two-tailed Student's *t* tests. Mean levels of total and bioavailable estradiol were compared by ER polymorphisms in women of the subcohort using ANOVA tests adjusted for study center and traditional cardiovascular risk factors including age, BMI, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, and smoking status. In addition, Pearson's correlations were estimated between hemostatic variables and estradiol by ER genotype in the subcohort.

The association of both total and bioavailable estradiol and ER polymorphisms with IAD risk and their interactions were investigated using weighted Cox proportional-hazards models adapted for the case-cohort design by the method of Barlow and colleagues (32, 33). Because age is sharply associated with IAD risk, age as a time scale was used as recommended (34). The proportional hazards assumption was checked for each model. Additive, dominant, and recessive models were initially examined to determine which genetic model best described the data. Therefore, results are presented assuming a genotype model in dominant model with a two-level categorical variable. The hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs) by ER genotypes were estimated for a 1-SD increase in the log-trans-

formed hormone distribution. Hormones \times ER genotypes interaction terms were introduced into statistical models. The HRs for IAD were adjusted for study center and traditional cardiovascular risk factors including BMI as a continuous variable, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, and smoking status. In addition, the Bonferroni correction was applied to correct for multiple testing by multiplying the single *P* values by the number of single-nucleotide polymorphism ($n = 5$) and maintaining the threshold significance at $P = .05$.

For total estradiol, the HRs for IAD were further adjusted for hemostatic and inflammation markers including fibrinogen, thrombin generation, von Willebrand factor, fibrin D-dimer, hs-CRP to evaluate the part of the excess risk explained by these variables. Of note, the data on hemostatic and inflammation variables were missing for 25 subjects.

For each ER polymorphism, the risk of IAD was also investigated by tertiles of hormone distribution, and the low tertile was chosen as the reference group. Tests for linear trend across the three categories of hormones levels were used to investigate the significance of the variables, after having evaluated the linearity of the associations. To assess the linearity of the relation of hormones levels with IAD risk, we used tests based on the difference in the log likelihood between two models of prediction (one with two dummy variables corresponding to the tertiles of the hormones levels and the other including the qualitative ordinal variable in three categories). All tests were nonsignificant and we did not reject the hypothesis of linearity.

Finally, a separate analysis was performed for CHD and ischemic stroke, including the first arterial event. Similarly to analyses on IAD risk, the HRs of CHD and ischemic stroke in relation to the hormone levels were estimated by ER polymorphisms with a multivariate Cox model.

Values of $P < .05$ from two-sided tests were considered to indicate statistical significance. Statistical analyses were performed with the Statistical Analysis System software version 9.2 (SAS Institute Inc).

Results

Baseline characteristics are described for 533 women in the whole subcohort and according to the *rs9340799* genotype (Table 1). The distribution of *ESR1 rs9340799* polymorphisms in the subcohort was similar to those expected in Caucasian subjects, as follows: 45.6%, 42.9%, and 11.5% for AA, AG, and GG, respectively. No significant difference in age, BMI, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, and status smoking was detected between women with the *rs9340799*-AA genotype and those with the *rs9340799*-AG/GG genotype. Mean levels of total and bioavailable estradiol were similar across *rs9340799* genotypes. There was no significant association of total and bioavailable estradiol levels with other ER polymorphisms (data not shown).

The genotypic frequencies of ER polymorphisms were in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium. The two *ESR1* polymorphisms were in strong linkage disequi-

Table 1. Baseline Characteristics of Participants in Subcohort of 3C Study by *ESR1 rs9340799* Genotype

Characteristic	All Subjects (n = 533)	<i>ESR1 rs9340799</i> Genotype ^a		P Value ^b
		AA (n = 241)	AG/GG (n = 288)	
Age, mean (SD), y	74.4 (5.3)	74.8 (5.2)	74.1 (5.4)	.11
BMI, mean (SD), kg/m ²	25.7 (4.8)	25.8 (4.7)	25.7 (4.9)	.89
Hypertension, n, %	407 (76.4)	186 (45.9)	219 (54.1)	.76
Diabetes, n, %	38 (7.2)	17 (44.7)	21 (55.3)	.89
Hypercholesterolemia, n, %	338 (63.4)	160 (47.6)	176 (52.4)	.21
Smoking, n, %				
Never	435 (81.6)	202 (46.8)	230 (53.2)	.33
Past	73 (13.7)	27 (37.5)	45 (62.5)	
Current	25 (4.7)	12 (48.0)	13 (52.0)	
Total estradiol, GM (IQR), pg/mL	5.24 (3.51–8.00)	5.23 (3.57–7.90)	5.28 (3.15–8.33)	.87
Bioavailable estradiol, GM (IQR), pg/mL	3.50 (2.30–5.68)	3.52 (2.45–5.63)	3.51 (2.14–5.89)	.99

Abbreviations: GM, geometric mean; IQR, interquartile range.

^a Four missing values.

^b P value obtained from t tests or χ^2 tests for all characteristics except for total estradiol (ANOVA adjusted for study center and traditional cardiovascular risk factors including age, BMI, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, and smoking status).

librium and so were the three *ESR2* polymorphisms (all D' ranged from 0.90 to 1.00).

No significant association was found between IAD risk and the different ER polymorphisms (data not shown). After adjustment for traditional cardiovascular risk factors including BMI, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, and smoking status, plasma total estradiol levels were positively associated with IAD risk in the whole population sample (HR 1.40 for 1-SD log estradiol change, 95% CI 1.11–1.77). Adjusted HR for IAD events and 95% CI in relation to total estradiol levels by ER polymorphisms are given in Table 2 before and after Bonferroni correction. With regard to *ESR1 rs9340799* polymorphism, the risk of IAD was positively associated with total estradiol in women with AA genotype but not in women with the AG/GG genotype (HR 1.62, 95% CI 1.22–2.17, and HR 1.03, 95% CI 0.81–1.30, respectively; *P* for interaction <.05). In women with the AA genotype, high levels of total estradiol increased significantly the risk of IAD compared with the lowest total estradiol levels (HR 3.78, 95% CI 1.59–8.99 for the highest tertile vs the lowest tertile, *P* for linear trend <.01). After Bonferroni correction for multiple testing, the total estradiol \times *rs9340799* genotype interaction remained significant. Similar results were found for bioavailable estradiol, but the interaction of hormone levels with *rs9340799* genotype on IAD risk was borderline significant after the Bonferroni correction (*P* = .07) (data not shown). In addition, similar associations were observed for the *rs2234693* polymorphism, although the interaction between total estradiol levels and the *rs2234693* polymorphism was not significant. No significant interaction was detected between hormones levels and ER- β polymorphisms on IAD risk.

Total estradiol was positively correlated to fibrinogen ($r = 0.21$, *P* < .01), peak height of thrombin generation ($r = 0.10$, *P* = .13), and hs-CRP ($r = 0.38$, *P* < .01) in women with the *rs9340799*-AA genotype. No significant correlation was found between other hemostatic parameters and total estradiol. After additional adjustment for all hemostatic variables, the HR for IAD risk in women carrying the AA genotype and without missing data for hemostatic variables (HR 1.58 for 1 SD log estradiol change, 95% CI 1.21–2.05) was reduced to 1.41 (95% CI 1.06–1.90), suggesting that hypercoagulability explained 29% of the excess risk of IAD. Adjustment for hs-CRP alone or combined with hemostatic variables made no substantial change to the results (data not shown).

When the analyses were stratified by type of arterial events (67 CHD and 38 ischemic stroke), total estradiol was positively associated with CHD risk in women with the *rs9340799*-AA genotype but not in women with the *rs9340799*-AG/GG genotype (adjusted and corrected HR 1.93, 95% CI 1.28–2.91, and HR 1.01, 95% CI 0.76–1.35, respectively; *P* for interaction <.05). No significant interaction was found between the *rs9340799* genotype and total estradiol for the risk of ischemic stroke.

Discussion

In this prospective study, neither estrogens levels nor IAD risk was significantly associated with ER polymorphisms in older postmenopausal women. However, we found that genetic variations in *ESR1* modified the risk of IAD related to high endogenous estradiol levels. Endogenous estrogens were positively associated with IAD risk in women carrying *rs9340799*-AA genotype but not in women car-

Table 2. Hazard Ratios of IAD Events in Relation to 1-SD Log Increase in Total Estradiol Levels by ER Polymorphisms Among 623 Postmenopausal Women of 3C Case-Cohort Study

Ischemic Arterial Disease (n = 623) ^a										Marginal P Interaction	Corrected P Interaction ^c
	Events, n	HR (95% CI)	Marginal P ^b	Corrected P ^c	Events, n	HR (95% CI)	Marginal P ^b	Corrected P ^c			
ESR1											
rs2234693 ^d	TT (n = 190)				TC/CC (n = 421)						
Total estradiol, pg/mL											
For 1-SD log	29	1.52 (1.06–2.18)	.02	.11	74	1.15 (0.94–1.42)	.18	.91	.13	.65	
T1 < 4.21	4	1 (Reference)	.04	.22	20	1 (Reference)	.44	1.00			
T2 (4.21–7.27)	13	3.39 (1.02–11.29)			28	1.61 (0.90–2.89)					
T3 ≥ 7.27	12	3.09 (0.98–9.82)			26	1.25 (0.65–2.38)					
rs9340799 ^d	AA (n = 280)				AG/GG (n = 338)						
Total estradiol, pg/mL											
For 1-SD log	47	1.62 (1.22–2.17)	<.01	<.05	56	1.03 (0.81–1.30)	.84	1.00	.01	<.05	
T1 < 4.21	7	1 (Reference)	<.01	<.05	18	1 (Reference)	.54	1.00			
T2 (4.21–7.27)	19	3.14 (1.33–7.45)			21	1.22 (0.65–2.27)					
T3 ≥ 7.27	21	3.78 (1.59–8.99)			17	0.76 (0.36–1.61)					
ESR2											
rs1256049 ^d	GG (n = 559)				AG/AA (n = 56)						
Total estradiol, pg/mL											
For 1-SD log	100	1.22 (1.01–1.48)	.04	.20	5	3.06 (0.53–17.76)	.21	1.00	.30	1.00	
T1 < 4.21	23	1 (Reference)	.10	.50	3						
T2 (4.21–7.27)	40	1.79 (1.06–3.02)			1	NA					
T3 ≥ 7.27	37	1.60 (0.91–2.82)			1	NA					
rs4986938 ^d	AA (n = 100)				AG/GG (n = 516)						
Total estradiol, pg/mL											
For 1-SD log	21	1.85 (1.17–2.94)	<.01	<.05	84	1.09 (0.88–1.34)	.42	1.00	.10	.50	
T1 < 4.21	1	1 (Reference)	<.01	<.05	25	1 (Reference)	.75	1.00			
T2 (4.21–7.27)	12	22.47 (2.20–229.87)			29	1.03 (0.60–1.76)					
T3 ≥ 7.27	8	9.65 (0.91–102.43)			30	1.10 (0.62–1.95)					
rs1271572 ^d	GG (n = 206)				GT/TT (n = 404)						
Total estradiol, pg/mL											
For 1-SD log	36	1.36 (0.95–1.94)	.09	.47	67	1.20 (0.96–1.51)	.11	.54	.68	1.00	
T1 < 4.21	8	1 (Reference)	.22	1.00	16	1 (Reference)	.37	1.00			
T2 (4.21–7.27)	14	1.96 (0.85–4.51)			27	1.57 (0.82–2.99)					
T3 ≥ 7.27	14	1.74 (0.68–4.44)			24	1.37 (0.69–2.73)					

Abbreviation: NA, not available. Model was adjusted for study center and traditional cardiovascular risk factors including BMI, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, and smoking status.

^a Including 67 CHD and 38 stroke events.

^b P value for continuous variable and P for trend for variable in tertiles.

^c P value after Bonferroni correction.

^d Twelve missed values for *rs2234693*, five for *rs9340799*, eight for *rs1256049*, seven for *rs4986938*, and 13 for *rs1271572*.

rying the *rs9340799*-AG/GG genotype. The excess risk of IAD in women with the AA genotype was partially explained by hypercoagulability. No interaction between estrogens levels and other ER polymorphisms was observed in relation to the risk of IAD.

Many studies have investigated the association of ER polymorphisms with the risk of IAD, but previous data led to conflicting results. The reasons for such discrepancies include differences in study population, design, and analysis together with a strong heterogeneity in quality of investigations (15). Importantly, although the effect of the ER polymorphisms on IAD may be different for women and men, few data were stratified by sex. Furthermore, the use of HT and/or menopause status were not taken into account in most studies among women and ultimately, only a few studies focused on postmenopausal women. A population-based prospective cohort study including 3488 older postmenopausal women showed a positive association of the *ESR1 rs2234693*-T/*rs9340799*-A haplotype with the risk of myocardial infarction (35). However,

although the results were adjusted for use of HT, no data were given among women not using estrogens. Consistently, another study having excluded women using HT, reported an increased risk of stroke in carriers of *ESR1 rs2234693*-TT (17). By contrast, a Japanese case-control study including highly selected postmenopausal women reported that the *ESR1 rs2234693*-CC and *rs9340799*-GG genotypes were more common in women with coronary artery disease than in the controls (36). With regard to *ESR2* polymorphisms, the Women's Health Study showed that the *rs1256049*-G and *rs1271572*-T alleles increased CHD but not stroke risk, whereas the *rs4986938* polymorphism was associated with neither CHD nor stroke (18). Most other investigations among postmenopausal women failed to detect an association of either CHD or stroke risk with the *ESR1* and *ESR2* polymorphisms (16, 19, 37–39). Therefore, our data are consistent with these null findings, which are also supported by a meta-analysis (15).

Few studies investigated the interaction between endogenous estrogens and ER polymorphisms in relation to

health outcomes in postmenopausal women. Interestingly, a Dutch case-cohort study showed that the positive association between estradiol and breast cancer risk was more pronounced among women with the *rs2234693*-CT/TT genotype than among those with the *rs2234693*-CC genotype (40). This result may be relevant to our finding because both *rs2234693* and *rs9340799* are in linkage disequilibrium. To our knowledge, the 3C study is the first to show that *ESR1* polymorphisms may modulate the association between endogenous estrogens and IAD risk. As previously described, plasma estrogens levels were positively associated with IAD risk in the whole population, irrespective of ER genotypes (9).

Adjustment for traditional cardiovascular risk factors yielded similar results, suggesting no major mediator role of obesity, diabetes, hypercholesterolemia, hypertension, and smoking status. Therefore, we can hypothesize that the relationship between endogenous estrogens and IAD risk among women with the *rs9340799*-AA genotype could be driven by other mechanisms involved in atherothrombosis such as inflammation and hypercoagulability. Both endogenous estrogens levels and IAD risk are known to be positively associated with CRP in postmenopausal women (21, 30, 41). Moreover, one study reported that the *rs2234693*-T allele carriers exhibited an enhanced inflammatory response compared with the CC homozygous (42). Of note, although *rs2234693* and *rs9340799* polymorphisms are in linkage disequilibrium, inflammation could be similarly increased in women with *rs9340799*-AA genotype as those with *rs2234693*-TT genotype. Nevertheless, in our study, the additional adjustment for hs-CRP did not change the results, suggesting that the inflammation did not explain the excess of IAD risk. Alternatively, given that high endogenous estrogens levels and IAD risk are known to be associated with hypercoagulability (20, 23, 29, 43), the association between endogenous estrogens and IAD risk could also be mediated through hemostatic variables. Interestingly, a nested case-control study in the Women's Health Initiative trials reported an increased response of plasmin-antiplasmin to HT in women with the *rs9340799*-AA genotype compared with women with the *rs9340799*-AG or *rs9340799*-GG genotypes (39).

Although exogenous and endogenous estrogens might have different metabolic and vascular effects, it can be suggested that high endogenous estrogens levels play a role in the thrombotic component of IAD through blood coagulation and fibrinolysis activation. In our study, hypercoagulability explained a substantial part of the relation between estrogens and IAD risk in women with the *rs9340799*-AA genotype. Further adjustment for hs-CRP did not change the results, suggesting that changes in coagulation pathway may be a more relevant mechanism

than inflammation to explain the effect of estradiol on IAD among these women. Other unmeasured hemostatic variables could also be involved in the association of IAD risk with estrogens in women with the *rs9340799*-AA genotype, and further data on clotting factors are required.

Increased IAD risk in women with elevated estrogens levels and carrying the *rs9340799*-AA genotype does not necessarily imply that relationship is causal. First, our findings could be due to the chance. Second, studied genetic variants may be highly correlated with other variants within *ESR1* or nearby genes that are themselves causal in the development of IAD, suggesting that the ER polymorphisms are not the only factor that determines the effect of estrogen on IAD. Few studies support the functional importance of *ESR1* polymorphisms altering the quantity or the quality of ER- α transcripts or resulting proteins and the underlying mechanisms related to a direct effect of ER polymorphism in vascular biology remain to be clarified (12, 28, 44). On the other hand, estradiol levels may have a genetic basis, especially due to variation in the aromatase gene as reported (45). Further data are needed to investigate the relevance of aromatase genetic polymorphisms to our findings.

The strengths of our study include the prospective population-based and multicenter cohort design with a high participation rate during the 4 years of follow-up. Moreover, baseline data were collected by a direct interview and high-quality methods of ascertainment of cardiovascular risk factors and disease outcome were used. In addition, estrogen measurements and genotyping were conducted without knowledge of the case or noncase status, using validated methodology. Furthermore, our genetic-association study cannot be influenced by stratification population or heterogeneity because most participants were Caucasian.

Our study has several limitations. First, the small number of incident cases may result in a lack of statistical power, especially for subgroup analyses by CHD or stroke event. In addition, multiple comparisons by different polymorphisms could result in falsely positive findings. However, our results remained significant after Bonferroni correction for multiple testing. Second, our population study included older women who were aged 73 years on average and mostly Caucasian. Our data cannot therefore be generalized to younger postmenopausal women or other ethnic groups. Third, due to the limited quantity of plasma, baseline estrogens were determined by direct RIAs, which are less reliable and accurate than chromatography/mass spectrometry, especially at low levels of estradiol in postmenopausal women (46). Nevertheless, we used an ultrasensitive RIA, with only 8% of estradiol values below the limit of quantitation, suggesting no misclassification in the

analyses by tertiles distribution. We acknowledge the lack of specificity and measurement error of direct RIAs, but these limitations may lead to underestimate but not cause associations between estrogens and clinical outcomes (1). On the other hand, the blood concentration of estrogens does not necessarily reflect the biologically active forms at the tissue level because they are dependent on the local enzyme activity and the binding on the protein transporters such as SHBG.

In conclusion, the *ESR1* rs9340799-AA genotype may increase the IAD risk related to high endogenous estrogens levels in older postmenopausal women, and hypercoagulability may explain a part of this excess of risk. These innovative results have the potential to improve the stratification of IAD risk in postmenopausal women whose IAD risk may depend on both plasma estrogens levels and the *ESR1* genotype and their interaction. However, further investigations with a larger sample size using validated chromatography/mass spectrometry are needed to replicate these findings and to assess the interaction between estrogens levels and *ESR1* genetics polymorphism on CHD and stroke risk separately.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Pierre-Yves Scarabin, MD, 16 Avenue Paul Vaillant Couturier, 94807 Villejuif Cedex, France. E-mail: pierre-yves.scarabin@inserm.fr.

The 3C Study is conducted under a partnership agreement between the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Victor Segalen-Bordeaux II University, and Sanofi-Aventis.

This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale for the preparation and initiation of the study. The 3C Study was also supported by the Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés, Direction Générale de la Santé, Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale, Institut de la Longévité, Conseils Régionaux de Aquitaine and Bourgogne, Fondation de France, and Ministry of Research-Institut National Santé et Recherche Médicale (INSERM) Cohortes et Collections de Données Biologiques Programme. Biological assays for hemostatic and hormone parameters were supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR 2007-LVIE-005-01). The experiments comply with the current laws of the country in which they were performed.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Rosner W, Hankinson SE, Sluss PM, Vesper HW, Wierman ME. Challenges to the measurement of estradiol: an Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:1376–1387.
2. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:606–616.
3. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, et al. Endogenous sex hormones as risk factors for dementia in elderly men and women. *J Gerontol Series A Biol Sci Med Sci*. 2007;62:1035–1041.
4. Carcaillon L, Garcia-Garcia FJ, Tresguerres JAF, Avila GG, Kireev R, Rodriguez-Manas L. Higher levels of endogenous estradiol are associated with frailty in postmenopausal women from the Toledo Study for Healthy Aging. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:2898–2906.
5. Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, et al. Relationship between higher estradiol levels and 9-year mortality in older women: the Invecchiare in Chianti study. *J Am Geriatr Soc*. 2009;57:1810–1815.
6. Rexrode KM, Manson JE, Lee IM, et al. Sex hormone levels and risk of cardiovascular events in postmenopausal women. *Circulation*. 2003;108:1688–1693.
7. Chen Y, Zeleniuch-Jacquotte A, Arslan AA, Wojcik O, et al. Endogenous hormones and coronary heart disease in postmenopausal women. *Atherosclerosis*. 2011;216:414–419.
8. Lee JS, Yaffe K, Lui LY, et al. Prospective study of endogenous circulating estradiol and risk of stroke in older women. *Arch Neurol*. 2010;67:195–201.
9. Scarabin-Carre V, Canonico M, Brailly-Tabard S, et al. High level of plasma estradiol as a new predictor of ischemic arterial disease in older postmenopausal women: the three-city cohort study. *J Am Heart Assoc*. 2012;1:e001388.
10. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340:1801–1811.
11. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Mechanisms of disease: production and actions of estrogens. *N Engl J Med*. 2002;346:340–352.
12. Herrington DM, Howard TD, Hawkins GA, et al. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease. *N Engl J Med*. 2002;346:967–974.
13. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*. 2006;116:561–570.
14. Saltiki K, Alevizaki M. Coronary heart disease in postmenopausal women; the role of endogenous estrogens and their receptors. *Hormones (Athens, Greece)*. 2007;6:9–24.
15. Lluis-Ganella C, Lucas G, Subirana I, et al. Qualitative assessment of previous evidence and an updated meta-analysis confirms lack of association between the *ESR1* rs2234693 (*PvuII*) variant and coronary heart disease in men and women. *Atherosclerosis*. 2009;207:480–486.
16. Molvarec A, Szeplaki G, Kovacs M, et al. Estrogen receptor α (*ESR1*) *PvuII* and *XbaI* gene polymorphisms in ischemic stroke in a Hungarian population. *Clin Chim Acta*. 2007;382:100–105.
17. Munshi A, Sharma V, Kaul S, et al. Estrogen receptor α genetic variants and the risk of stroke in a South Indian population from Andhra Pradesh. *Clin Chim Acta*. 2010;411:1817–1821.
18. Rexrode KM, Ridker PM, Hegener HH, Buring JE, Manson JE, Zee RYL. Polymorphisms and haplotypes of the estrogen receptor- β gene (*ESR2*) and cardiovascular disease in men and women. *Clin Chem*. 2007;53:1749–1756.
19. Markoula S, Milionis H, Lazaros L, et al. Associations of *ESR2* AluI (G/A) polymorphism with ischemic stroke in Caucasians. *J Neurol Sci*. 2012;316:126–130.
20. Canonico M, Brailly-Tabard S, Gaussem P, et al. Endogenous oestradiol as a positive correlate of plasma fibrinogen among older postmenopausal women: a population-based study (the Three-City cohort study). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77:905–910.
21. Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, et al. SHBG, Sex hormones, and inflammatory markers in older women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:1053–1059.
22. Alperovitch A. Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology*. 2003;22:316–325.
23. Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, et al. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with

- coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1445–1451.
24. Prentice RL. On the design of synthetic case-control studies. *Biometrics*. 1986;42:301–310.
 25. Wacholder S. Practical considerations in choosing between the case-cohort and nested case-control designs. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*. 1991;2:155–158.
 26. Ryan J, Carriere I, Carcaillon L, et al. Estrogen receptor polymorphisms and incident dementia: the prospective 3C study. *Alzheimers Dement*. 2014;10:27–35.
 27. Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, et al. Systematic mutation screening of the estrogen receptor β gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:4524–4527.
 28. Jeng MH, Shupnik MA, Bender TP, Westin EH, et al. Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells. *Endocrinology*. 1998;139:4164–4174.
 29. Carcaillon L, Gaussem P, Ducimetiere P, et al. Elevated plasma fibrin D-dimer as a risk factor for vascular dementia: the Three-City cohort study. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1972–1978.
 30. Straczek C, Ducimetiere P, Barberger-Gateau P, et al. Higher level of systemic C-reactive protein is independently predictive of coronary heart disease in older community-dwelling adults: the Three-City study. *J Am Geriatr Soc*. 2010;58:129–135.
 31. Tregouet DA, Garelle V. A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2007;23:1038–1039.
 32. Barlow WE. Robust variance estimation for the case-cohort design. *Biometrics*. 1994;50:1064–1072.
 33. Barlow WE, Ichikawa L, Rosner D, Izumi S. Analysis of case-cohort designs. *J Clin Epidemiol*. 1999;52:1165–1172.
 34. Korn EL, Graubard BI, Midthune D. Time-to-event analysis of longitudinal follow-up of a survey: choice of the time-scale. *Am J Epidemiol*. 1997;145:72–80.
 35. Schuit SCE, Oei HHS, Witteman JCM, et al. Estrogen receptor α gene polymorphisms and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 2004;291:2969–2977.
 36. Lu H, Higashikata T, Inazu A, et al. Association of estrogen receptor- α gene polymorphisms with coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 2002;22:817–823.
 37. Matsubara Y, Murata M, Kawano K, et al. Genotype distribution of estrogen receptor polymorphisms in men and postmenopausal women from healthy and coronary populations and its relation to serum lipid levels. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 1997;17:3006–3012.
 38. Kjaergaard AD, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, et al. Estrogen receptor α polymorphism and risk of cardiovascular disease, cancer, and hip fracture: cross-sectional, cohort, and case-control studies and a meta-analysis. *Circulation*. 2007;115:861–871.
 39. Rossouw J, Bray P, Liu JM, Kooperberg C, et al. Estrogen receptor polymorphisms and the vascular effects of hormone therapy. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 2011;31:464–469.
 40. Onland-Moret NC, van Gils CH, Roest M, Grobbee DE, Peeters PH. The estrogen receptor α gene and breast cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control*. 2005;16:1195–1202.
 41. Stork S, Bots ML, Grobbee DE, van der Schouw YT. Endogenous sex hormones and C-reactive protein in healthy postmenopausal women. *J Intern Med*. 2008;264:245–253.
 42. Mysliwska J, Rutkowska A, Hak L, Siebert J, Szyndler K, Rachon D. Inflammatory response of coronary artery disease postmenopausal women is associated with the IVS1-397T > C estrogen receptor α polymorphism. *Clin Immunol (Orlando, Fla.)*. 2009;130:355–364.
 43. Danesh J, Lewington S, Thompson SG, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA*. 2005;294:1799–1809.
 44. Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, et al. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation*. 2002;105:1879–1882.
 45. Haiman CA, Dossus L, Setiawan VW, et al. Genetic variation at the CYP19A1 locus predicts circulating estrogen levels but not breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Res*. 2007;67:1893–1897.
 46. Stanczyk FZ, Jurow J, Hsing AW. Limitations of direct immunoassays for measuring circulating estradiol levels in postmenopausal women and men in epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19:903–906.